

SEDIMENTATION VON NUCLEOIDEN AUS
THYMUS- UND MILZZELLEN DER RATTE
NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG
IN VITRO UND IN VIVO

von
Rüdiger Heinzelmann

Disbui. München

1987



Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. K. Tempel

SEDIMENTATION VON NUCLEOIDEN AUS
THYMUS- UND MILZZELLEN DER RATTE NACH
RÖNTGENBESTRAHLUNG IN VITRO UND IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Rüdiger Heinzelmann
aus
Heubach-Lautern

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

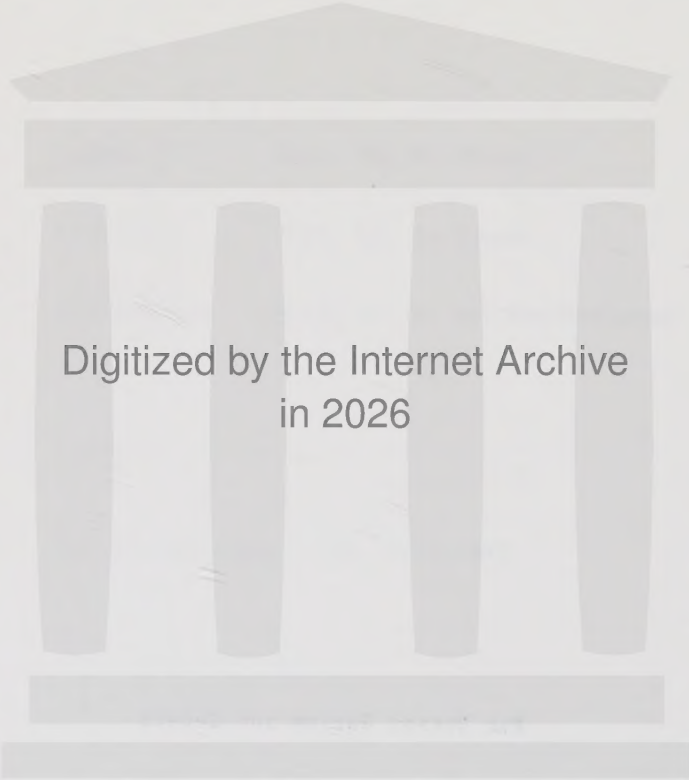
Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Korreferent: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Für Doris, Sabine und Robert



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>PROBLEMSTELLUNG</u>	1
2.	<u>EINLEITUNG</u>	3
2.1.	Prinzip der Nucleoidsedimentation	3
2.1.1.	Modifikationen der Nucleoidsedimentation	5
2.2.	<u>Zur Wirkung von ionisierender Strahlung auf das Lymphatische System</u>	13
2.2.1.	Grundsätzliches	13
2.2.2.	Zytologische Gesichtspunkte	16
2.2.3.	Zur Strahlenreaktion des Thymus	20
2.2.3.1.	Biochemische Veränderungen	20
2.2.3.1.1.	Allgemeines	20
2.2.3.1.2.	Sofortphase	22
2.2.3.1.3.	Frühphase	23
2.2.3.1.4.	Zwischenphase	24
2.2.3.1.5.	Spätphase	26
2.2.3.2.	Histologische Veränderungen am Thymus	27
2.2.3.2.1.	Allgemeines	27
2.2.3.2.2.	Sofortphase	28
2.2.3.2.3.	Frühphase	28
2.2.3.2.4.	Zwischenphase	28
2.2.3.2.5.	Spätphase	30
2.2.4.	Zur Strahlenreaktion der Milz	30
2.2.4.1.	Biochemische Veränderungen	30
2.2.4.1.1.	Allgemeines	30
2.2.4.1.2.	Sofortphase	32
2.2.4.1.3.	Frühphase	33
2.2.4.1.4.	Zwischenphase	34
2.2.4.1.5.	Spätphase	35
2.2.4.2.	Histologische Veränderungen an der Milz	36
2.2.4.2.1.	Allgemeines	36
2.2.4.2.2.	Sofortphase	38

2.2.4.2.3.	Frühphase	38
2.2.4.2.4.	Zwischenphase	39
2.2.4.2.5.	Spätphase	40
2.3.	<u>Mechanismus des Interphasetodes am Beispiel der Lymphozyten</u>	40
3.	<u>MATERIAL UND METHODIK</u>	46
3.1.	<u>Reagentien und Tiermaterial</u>	46
3.1.1.	Reagentien und Lösungen	46
3.1.2.	Tiermaterial und Tierhaltung	50
3.2.	<u>Behandlung der Tiere</u>	50
3.2.1.	Röntgenbestrahlungen	50
3.2.2.	Aufarbeitung der Tiere	51
3.3.	<u>Versuchsablauf</u>	52
3.3.1.	Gewinnung der Zellen aus Thymus und Milz	52
3.3.2.	Zellzählung	53
3.3.3.	Inkubationen	53
3.3.4.	Röntgenbestrahlung von Milz- und Thymuszellen in vitro	54
3.3.5.	Gewinnung und Zentrifugation der Nucleoide	54
3.3.6.	Bestimmung der DNA-Konzentration	56
3.3.6.1.	Aufstellung der DNA-Eichkurve	56
3.3.6.2.	Bestimmung der DNA-Konzentrationen der verschiedenen Zellsuspensionen	58
3.3.7.	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	58
4.	<u>ERGEBNISSE</u>	59
4.1.	<u>In vitro-Versuche</u>	59
4.1.1.	Hyperthermie	59
4.1.2.	Röntgenstrahlen	63
4.1.3.	Ethidiumbromid	63
4.1.4.	Ethidiumbromid und Röntgenstrahlen	63
4.1.5.	3-Aminobenzamid und Röntgenstrahlen	63

4.1.6.	1- β -D-Arabinofuranosylcytosin(araC)-, 3',5'-Dideoxythymidin(ddT)- Gemisch und Röntgenstrahlen	64
4.1.7.	Novobiocin	64
4.1.8.	Novobiocin und Röntgenstrahlen	65
4.2.	<u>In vivo-Versuche</u>	65
4.2.1.	Versuche zur Zeitabhängigkeit	65
4.2.2.	Versuche zur Dosisabhängigkeit	66
4.2.2.1.	Aufarbeitung unmittelbar nach Exposition	66
4.2.2.2.	Aufarbeitung 6 Stunden nach Exposition	70
4.2.2.3.	Aufarbeitung 24 Stunden nach Exposition	76
4.2.3.	Versuche zum Mechanismus der Beschleunigung der Nucleoidsedimentation nach Ganzkörperröntgenbestrahlung	76
4.2.4.	Versuche zur Erklärung des "Extrabandenphänomens"	83
5.	<u>DISKUSSION</u>	84
5.1.	<u>Zur Methode der Nucleoidsedimentation</u>	84
5.2.	<u>Zur Wirkungsweise der bei den in vitro-Versuchen eingesetzten Testagentien</u>	86
5.2.1.	Hyperthermie	86
5.2.2.	Röntgenstrahlen	87
5.2.3.	Ethidiumbromid (EB)	91
5.2.4.	3-Aminobenzamid (3-AB)	93
5.2.5.	1- β -D-Arabinofuranosylcytosin-, 3',5'-Dideoxythymidin-Gemisch und Röntgenstrahlen	94
5.2.6.	Novobiocin	94
5.3.	<u>In vivo-Versuche</u>	96
5.3.1.	Vergleich der in vivo-Versuche mit den in vitro-Versuchen	96
5.3.2.	Zelluläre und subzelluläre Phänomene der Sedimentationsbeschleunigung	99

5.3.3.	Nucleoidbanden besonders geringer Sedimentierbarkeit ("Extrabanden")	102
5.4.	<u>Schlußfolgerungen</u>	105
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	107
	<u>SUMMARY</u>	109
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	111

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

araC	-	1- β -D-Arabinofuranosylcytosin
ATP	-	Adenosintriphosphat
ATPase	-	Adenosintriphosphatase
Bb	-	Bisbenzimid
cGy	-	Zentigray ^{a)}
CoA	-	Coenzym A
CsCl	-	Cäsiumchlorid
Cu	-	Kupfer
°C	-	Grad Celsius
d	-	Tag
ddT	-	3', 5'- Dideoxythymidin(ddT)
DNA	-	Desoxyribonucleinsäure
DNP	-	Desoxyribonucleoprotein
EB	-	Ethidiumbromid
EDTA	-	Äthylendiamintetraessigsäure
g	-	Erdbeschleunigung (9,81m/sec ²)
Gy	-	Gray ^{a)} (Energiedosisseinheit)
HCl	-	Salzsäure
kV	-	Kilovolt
LD _{50/30}	-	Dosis, bei welcher 50% der Individuen eines Kollektivs innerhalb von 30 Tagen getötet werden
mA	-	Milliampere
MW	-	Molekulargewicht
NAD	-	Nicotinamid-adenin-dinucleotid

a) Für die ältere Energiedosisseinheit rad(rd) gilt:
1 rd = 1 cGy (0,01 Gy)

NADH	-	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	-	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	-	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
p	-	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.i.	-	nach Röntgenbestrahlung
PBS	-	Phosphatpufferlösung
PDN	-	Desoxyribopolynucleotide
R	-	Röntgen (ältere Ionendosiseinheit)
RNA	-	Ribonucleinsäure
SH	-	Sulphydril
U	-	Umdrehungen
UV	-	Ultraviolett
v	-	Volumen

1. PROBLEMSTELLUNG

Nucleoide sind Zellkernpartikel, welche die Desoxyribonucleinsäure (DNA) des Zellkerns, Ribonucleinsäure und Spuren von Protein enthalten. Bei Aufschluß von Zellen in Medien hoher Salzkonzentration in Gegenwart nicht-ionischer Detergentien bilden die Nucleoide einer Zellpräparation ein gelartiges Aggregat, das bei Ultrazentrifugation in einem neutralen Saccharosegradienten als einheitliche Fraktion sedimentiert. Die Nucleoidbande kann durch Zusatz geeigneter Fluorogene aufgrund der Fluoreszens im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Unter standardisierten Bedingungen spiegelt die Sedimentierbarkeit der Nucleoide den Relaxationsgrad bzw. die superhelikale Struktur der DNA wider. DNA-Strangbrüche erhöhen die DNA-Relaxation und vermindern somit die Nucleoidsedimentation. Sollen z.B. Strahlenschäden in vitro nachgewiesen werden, gehört die Nucleoidsedimentation zu den empfindlichsten Methoden. Über die Eignung der Methode zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen in vivo liegen bisher m.W. keine Erfahrungen vor. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Sedimentation von Nucleoiden des Thymus von Ratten nach Ganzkörperperröntgenbestrahlung untersucht. Die Nucleoidsedimentation von Thymus- und Milzzellen nach Strahlenexposition in vitro hatte orientierenden Charakter. Durch gleichzeitige Einwirkung von Zusatzagentien (Hyperthermie sowie Hemmstoffe der DNA-Synthese und DNA-Reparatur) sollte die Fra-



ge beantwortet werden, ob sich die Empfindlichkeit der Nucleoidsedimentation durch Sekundärnoxen steigern läßt.

2. EINLEITUNG

2.1. Prinzip der Nucleoidsedimentation

(Übersichten s. unter Ziffer 14, 4, 93)

Die Nucleoidsedimentation ist eine qualitative und quantitative physikalische Nachweismethode zur Bestimmung des Relaxationsgrades der Desoxyribonucleinsäure (93, 59). Die Methode wurde zum ersten Mal 1975 von COOK und BRAZELL beschrieben und später mehrfach modifiziert.

Wichtige Voraussetzungen für den Sedimentationsvorgang betreffen den (neutralen) Saccharosegradienten (der in einer durchsichtigen Zentrifugenhülse aufgebaut wird), das auf den Gradienten aufgetragene Lysemedium (das sich vor allem durch eine hohe Salzkonzentration und ein nichtionisches Detergenz auszeichnet) und die zu untersuchende Zellsuspension. Die ungefähren Volumenverhältnisse der einzelnen Schichten sind aus nachstehender Schemazeichnung zu ersehen (Abb.1). Durch Einwirken des Lysemediums auf die Zellsuspension werden innerhalb einer bestimmten Zeit die Zellen aufgeschlossen und aus den Zellkernen die meisten Proteine entfernt. Die so entstandenen Zellkernpartikel, die dann nur noch aus DNA in nativer superhelikaler Form, Ribonucleinsäure (RNA) und Spuren von Protein bestehen, werden Nucleoide genannt. Während der Sedimentation verbindet sich der im Gradienten befindliche Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. Ethidiumbromid (EB) oder Bisbenzimid (Bb), mit den Nucleo-

iden, die nicht als einzelne Partikel, sondern als ein gemeinsames gelartiges Aggregat sedimentieren, das im UV-Licht als einheitliche Bande fluoresziert. Selbst wenn die Zellzahl pro Gradient abnimmt oder eine Mischung aus geschädigten und intakten Nucleoiden der Zentrifugation ausgesetzt wird, entsteht ein einziges Aggregat (Abb.1).

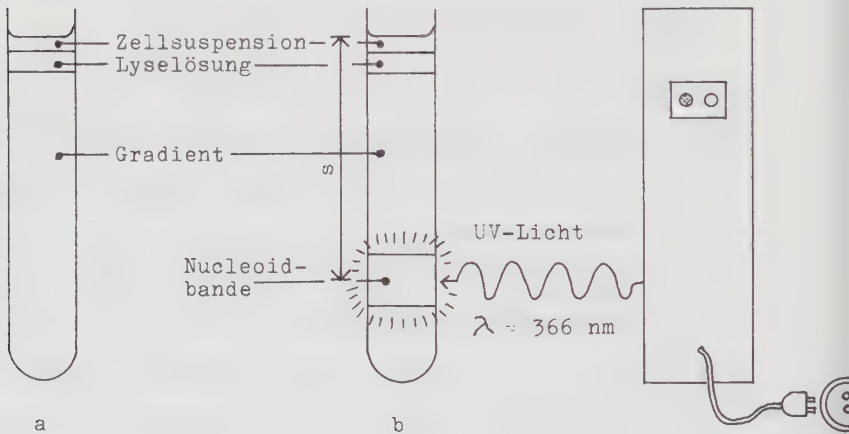


Abb.1: Methode der Nucleoidsedimentation schematisch.
a bzw. b: vor bzw. nach der Zentrifugation;
s : Sedimentationsstrecke

Die DNA der Nucleoide wird durch Reste von Membranen und Proteinen stabilisiert, wodurch die freie Drehbarkeit der DNA sehr eingeschränkt ist. Die intakte DNA weist noch alle negativen superhelikalen Windungen auf und bleibt "kompakt". Die Kompaktheit geht aber verloren, wenn durch Einzel- oder Doppelstrangbrüche, z.B. durch Einwirkung von ionisierenden Strahlen, die freie Drehbarkeit der DNA erhöht ist, und die negativen superhelikalen Windungen verschwinden. Es kommt zu einer Auflockerung der DNA-Struktur. Diese Strukturänderung der DNA macht sich im Sedimentationsverhalten der Nucleoide derart bemerkbar, daß die Banden geschädigter Nucleoide nach einer gewissen Zentrifugationszeit hinter den Banden intakter Kontrollnucleoide zurückbleiben. Das unterschiedliche Sedimentationsverhalten der Nucleoide von Zellen mit intakter und geschädigter DNA spiegelt somit den tatsächlich noch vorhandenen Schädigungsgrad wider. Daher erlauben Sedimentationen, die nach unterschiedlichen Erholungszeiten der geschädigten Zellen durchgeführt werden, auch Rückschlüsse auf stattgefundene Reparaturvorgänge.

2.1.1. Modifikationen der Nucleoidsedimentation

Die Bedingungen der Nucleoidsedimentation wurden je nach Versuchszweck von einzelnen Autoren abgewandelt. Einen Überblick über solche Modifikationen gibt Tab.1.

Tab.1: Modifikationen der Nucleoidsedimentation. GRADIENT: Volumen und chemische Zusammensetzung eines Gradienten. LYSELÖSUNG: Volumen und chemische Zusammensetzung der pro Gradient aufgetragenen Lyselösung. ZELLSUSPENSION: Volumen und Zellzahl der pro Gradient aufgetragenen Zellsuspension. ZENTRIFUGATION: 1.Zeile: Hersteller der Zentrifuge, 2.Zeile: Rotortyp. Abkürzungen: Sacch.: Saccharose, k.A.: keine Angabe, Bb: Bisbenzimid

AUTOR (EN)	COOK et al. 1975 (14)	COOK et al. 1976 (15)	BENYAJATI et. al. 1976 (4)
GRA- DI- ENT	4,6 ml 15-30% Sacch. 1,0 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris 0,001 mol/l EDTA pH 8,0 EB oder andere Agentienmenge variiert	4,6 ml 15-30% Sacch. 1,95 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris 0,001 mol/l EDTA pH 8,0 EB: variiert	4,9 ml 15-30% Sacch.(w/v) 0,9 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris-HCl 0,01 mol/l EDTA pH 8,0
LY- SE- LÖ- SUNG	0,15 ml 1,0 mol/l NaCl 0,1 mol/l EDTA 0,002 mol/l Tris pH 8,0 0,5% Triton X-100	0,15 ml 1,95 mol/l NaCl 0,1 mol/l EDTA 0,002 mol/l Tris 0,5% Triton X-100	0,3 ml 0,9 mol/l NaCl 0,4% Nonidet P40 0,01 mol/l Tris-HCl pH 8,0 10% Sacch. pankreatische DNaseI pankreatische RNase
ZELL- SUS- PEN- SION	0,05 ml PBS mit 1-5 x10 ⁵ mensch- liche HeLa Zellen	0,05 ml PBS mit 2-5 x10 ⁵ mensch- liche Leukozyten	0,1 ml 1-2 x10 ⁶ Zellkultur- zellen von Drosophila melanogaster/ml mit ¹⁴ C-Leucin-markierter T4D Phage
LYSE- ZEIT	15 min	15 min	k.A.
ZEN- TRI- FU- GA- TION	BECKMAN L2-65 b SW 50.1 5-10 ³ U/min 25 oder 80 min 20°C ohne Bremse	BECKMAN L2-65 b SW 50.1 30x10 ³ U/min 25 min 20°C	BECKMAN L5-50 SW 50.1 2 Stufen: 10 ³ U/min 5 min 8x10 ³ U/min 45 min 4°C

AUTOR (EN)	WENIGER 1978 (93)	WENIGER 1982 (92)	WENIGER modifiziert nach TEMPEL
GRA- DI- ENT	12 ml 15-30% Sacch. 1,5 mol/l NaCl 0,02 mol/l Tris- HCl 0,001 mol/l EDTA-Na ₂ pH 8,0 EB: 30 µg/ml	12 ml 15-30% Sacch.(w/v) 1,5 mol/l NaCl 0,02 mol/l Tris- HCl 0,001 mol/l EDTA pH 8,0 EB: 30 µg/ml	9,87 ml 15-30% Sacch.(w/w) 1,5 mol/l NaCl 0,02 mol/l Tris- HCl 0,001 mol/l EDTA-Na ₂ pH 8,0 EB: 30 µg/ml
LY- SE- LÖ- SUNG	0,4 ml 1,5 mol/l NaCl 0,1 mol/l EDTA pH 8,0 0,7% Triton X-100	0,5 ml 1,5 mol/l NaCl 0,1 mol/l EDTA pH 8,0 0,7% Triton X-100	0,34 ml 1,5 mol/l NaCl 0,1 mol/l EDTA-Na ₂ pH 8,0 0,7% Triton X-100
ZELL- SUS- PEN- SION	0,2 ml 10 ⁷ Zellen ^{a)} /ml in PBS oder Nähr- medium	0,2 ml PBS oder Medium mit 2-3x10 ⁶ Thymus- zellen der Maus ^{b)}	0,25 ml oder 0,17 ml 15x10 ⁶ Milz- oder Thymuszellen von Ratten/ml
LYSE- ZEIT	15 min bei Raumtemperatur	15 min	30 min bis 60 min, 20°C
ZEN- TRI- FU- GA- TION	BECKMAN SW 40 von Zellart ab- hängig 20°C	BECKMAN SW 40 25x10 ³ U/min (78x10 ³ g) 90 min	BECKMAN L2 SW 41 25x10 ³ U/min 120 min 20°C

a) verschiedene Zellarten

b) bei Verwendung von HeLa-Zellen: Gradient in 4 ml Polycarbonat-Röhrchen, 10⁶ Zellen/Gradient, 90 min Zentrifugation bei 4000 U/min in normaler Laborzentrifuge

AUTOR (EN)	LIPETZ et al. 1982 (32)	MICHEL et al. 1982 (39)	LANGROCK 1982 (30)
GRA- DI- ENT	3,6 ml 15-30% Sacch.(w/v) 1,95 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris- HCl 0,01 mol/l EDTA pH 8,0 EB: variiert	15-30% Sacch. 1,95 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris 0,001 mol/l EDTA pH 8,0 EB: 0-15 µg/ml	4,6 ml 5-20% Sacch. 1,0 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris 0,001 mol/l Chelaplex II EB: 1 mg/ml
LY- SE- LÖ- SUNG	0,15 ml 2,6 mol/l NaCl 0,0133 mol/l EDTA 0,013 mol/l Tris- HCl pH 8,0 0,13% Triton X-100	0,15 ml 1,95 mol/l NaCl 0,1 mol/l EDTA 0,002 mol/l Tris pH 8,0 0,5% Triton X-100	0,2 ml 0,2% Na-desoxy- cholat 1% Na-dodecyl- sulfat 0,01 mol/l Na- zitrat 0,001 mol/l Chelaplex III pH 7,2
ZELL- SUS- PEN- SION	0,05 ml; in vivo: 5x10 ⁵ Kerne von Leberzellen von Ratten in PBS ^{c)}	0,05 ml mit 10 ⁵ menschl. Lymphozyten	0,1 ml mit 2x10 ⁵ menschl. Lymphozyten
LYSE- ZEIT	15 min	15 min; 20°C	k.A.
ZEN- TRI- FU- GA- TION	BECKMAN L 5-50 in vivo: SW 56 ^{d)} 5x10 ³ U/min 4h oder 5x10 ³ U/min 5 min, dann 30x10 ³ U/min 60 min; 23°C	BECKMAN SW 50-1 45x10 ³ U/min 40 min 20°C	Ultrazentrifuge VAC 602 Swing-out-Rotor 30x10 ³ U/min 60 min 22°C

c) in vitro: 1,5x10⁴ bis 5x10⁵ menschl. Hautfibroblasten
d) in vitro: SW 27

AUTOR (EN)	MULLENDERS et al. 1983 (42)	MC GINNIS et al. 1983 (38)	ALDENHOFF et al. 1984 (1)
GRA- DI- ENT	15-30% Sacch. 2 mol/l NaCl 0,025 mol/l Tris- HCl pH 8,0 65% Sacch.-Kissen das 0,4 g CsCl/ml enthält	15-30% Sacch. 1,95 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris- HCl 0,001 mol/l EDTA pH 8,0 EB: 2-25 µg/ml	4,5 ml 12-43% Sacch. 2 mol/l NaCl 0,01 mol/l EDTA pH 8,0 EB: 30 µg/ml
LY- SE- LÖ- SUNG	2 mol/l NaCl 0,025 mol/l Tris- HCl 0,01 mol/l EDTA pH 8 0,5% Triton X-100	2 Schichten: 1) 0,2 ml mit 1,95 mol/l NaCl 0,1 mol/l EDTA 0,01 mol/l Tris- HCl 0,5% Triton X-100 2) 0,1 ml 2% Sarkosyl- Lösung	0,3 ml 2 mol/l NaCl 0,01 mol/l EDTA 0,5% Triton X-100
ZELL- SUS- PEN- SION	0,1 ml mit 0,08-0,17x10 ⁶ HeLa-Zellen	0,1 ml mit 0,5-2x10 ⁵ Em- bryofibrobla- sten (Maus)	0,1 ml mit 2-2,5x10 ⁵ mensch- lichen Fibrobla- sten ^{e)}
LYSE- ZEIT	k.A.	40 min; 20°C im Dunkeln	k.A.
ZEN- TRI- FU- GA- TION	BECKMAN Spinco SW 41T 15x10 ³ U/min 2 h 4°C	BECKMAN L2-65B SW 50.1 30x10 ³ U/min 30 min 20°C	BECKMAN SW 50.1 13x10 ³ bzw. 15x10 ³ U/min 45 min 20°C

e) oder HeLa-Zellen

AUTOR (EN)	BRYANT et al. 1984 (8)	SCHWARZ et al. 1984 (59)	ROMAGNA et al. 1985 (53)
GRA- DI- ENT	13 ml 15-30% Sacch. 1 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris- HCl 0,001 mol/l EDTA pH 8	5 ml 15-30% Sacch. 1,5 mol/l NaCl 0,02 mol/l Tris- HCl 0,001 mol/l EDTA- Na ₂ pH 8 EB: 30 µg/ml	5 ml 15-30% bzw. 12,5- 25% Sacch. (w/w) 2 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris 0,01 mol/l EDTA pH 8 Hoechst dye 33258 (Bb) 1 µg/ml
LY- SE- LÖ- SUNG	0,15 ml 1 mol/l NaCl 0,1 mol/l EDTA 0,003 mol/l Tris- HCl pH 7 6,7 g/l Triton X-100	0,2 ml 1,5 mol/l NaCl 0,1 mol/l EDTA pH 8 0,7% Triton X-100	2 mol/l NaCl 0,01 mol/l EDTA 0,01 mol/l Tris pH 8 0,5% (v/v) Triton X-100
ZELL- SUS- PEN- SION	0,05 ml PBS mit 10 ⁶ Ehrlich- Ascites-Tumor- zellen	0,1 ml mit 80x10 ³ menschl. Lymphozyten oder "Reh"-Zellen	0,05 ml mit 4-8x10 ⁵ Lungen- oder Leberzellen von Mäusen
LYSE- ZEIT	15 min	15 min im Dunkeln; 20°C	20 min
ZEN- TRI- FU- GA- TION	BECKMAN SW 40.1 5x10 ³ U/min 2 h	BECKMAN L5 SW 50.1 25x10 ³ U/min 30 min ("Reh"- Zellen) 50 min (menschl. Lymphozyten) 20°C	BECKMAN L5-50B SW 50.1 25x10 ³ (Leberz.) bzw. 40x10 ³ (Lun- genzellen) U/min 30 min 4°C

AUTOR (EN)	van RENSBURG et al. 1985 (52)	KULKARNI et al. 1985 (28)	FARZANEH et al. 1985 (17)
GRA- DI- ENT	37 ml 15-30% Sacch.(w/v) 1,95 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris 0,001 mol/l EDTA pH 8 Hoechst dye 33258 (Bb) 1 µg/ml	5 ml 15-30% Sacch. 1,95 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris 0,001 mol/l EDTA pH 8 0,5 ml von 60% Sacch. als Kissen	15-30% ^{g)} bzw. 5-20% ^{h)} Sacch. 2 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris- HCl 0,01 mol/l EDTA pH 8 EB: 30 µg/ml
LY- SE- LÖ- SUNG	0,3 ml 1,95 mol/l NaCl 0,002 mol/l Tris 0,1 mol/l EDTA 0,5% Triton X-100	0,15 ml 2,6 mol/l NaCl 0,0026 mol/l Tris 0,133 mol/l EDTA 0,67% Triton X-100 0,67% Sarcosyl	2 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris-HCl pH 8 0,01 mol/l EDTA 0,5% Triton X-100 (v/v) EB: 30 µg/ml
ZELL- SUSP.	0,1 ml mit 0,5-1x10 ⁶ Zellen ⁱ⁾	0,05 ml in PBS Kolonzellen(Maus)	k.A.
LYSE- ZEIT	20 min 20°C	30 min im Dunkeln	15 min im Dunkeln; 20°C
ZEN- TRI- FU- GA- TION	BECKMAN L8-70 VTi 50 10 ⁵ g 25 min 20°C	BECKMAN L2 SW 50.1 25x10 ³ U/min 30 min 20°C	BECKMAN SW 50.1 10x10 ³ U/min } g 45 min } oder SW 41 } 25x10 ³ U/min } h 30 min }

g) für Myoblasten

h) für Lymphozyten

i) menschliche Lymphozyten

AUTOR (EN)	KIM et al. 1986 (27)	OLIVE et al. 1986 (47)
GRA- DI- ENT	4,2 ml 15-30% Sacch. 2 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris- Puffer 0,001 mol/l EDTA	15 ml 15-30% Sacch. 1,95 mol/l NaCl 0,01 mol/l Tris 0,001 mol/l EDTA pH 8 Hoechst dye 33258(Bb) 0,5 µg/ml
LY- SE- LÖ- SUNG	0,15 ml 2 mol/l NaCl 0,002 mol/l Tris- Puffer 0,1 mol/l EDTA 0,5% Triton X-100 (v/v)	2,5 mol/l NaCl 0,0027 mol/l Tris 0,13 mol/l EDTA pH 8 0,67% Triton X-100
ZELL- SUSP.	2 ml mit 2-5x10 ⁵ Zellen ^{k)}	5x10 ⁴ Zellen ^{l)}
LYSE- ZEIT	k.A.	15 min
ZEN- TRI- FU- GA- TION	BECKMAN L2 SW 50.1 1,3x10 ⁵ g 30 min 20°C	BECKMAN ^{m)} SW 27 9x10 ³ U/min 60 min

k) Zellkulturzellen (menschliche Lymphozyten)

l) Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters

m) unbestrahlte Nucleoide wurden bis zum Boden des Zentrifugenröhrchens zentrifugiert

Die Autoren, die den Saccharosegradienten keinen Fluoreszenzfarbstoff beifügten, machten die Nucleoidbande nicht direkt in der Zentrifugenhülse durch UV-Bestrahlung sichtbar. Einige von ihnen fraktionierten den Gradienten und ermittelten den Nucleoidgehalt der so erhaltenen Fraktionen mit unterschiedlichen Methoden, wie z.B. Szintillationszählung nach vorheriger radioaktiver Markierung der Zellen.

2.2 Zur Wirkung von ionisierender Strahlung auf das lymphatische System

2.2.1. Grundsätzliches

Ionisierende Strahlen besitzen die Fähigkeit, Ionisationen auszulösen, d.h. den Atomen des durchstrahlten Mediums Hüllenelektronen zu entreißen. Schwächere Wechselwirkungen führen zu Anregungsvorgängen. Ionisationen und Anregungen leiten einen Reaktionsablauf ein, der über vielfältige physikalische, chemische und biologische Wechselwirkungen zur Schädigung von Zellen, Geweben, Organen und Organismen führen kann. Zu den strahlenempfindlichsten Geweben des Säugetierorganismus gehören Gewebe mit einem hohen Anteil an teilungsaktiven Zellen sowie das Lymphatische System (81). Das Lymphatische System besteht aus lymphatischen Organen (Thymus, Milz, Lymphknoten) und lymphatischem Gewebe, das sich in Form von einzelnen oder gruppenweise angeordneten Lymphfollikeln u.a. in der Darmschleimhaut, der Schleimhaut der Atemwege und des Urogenitaltraktes sowie in der Kon-

unctiva des Auges befindet. Der Lymphfollikel, auch Sekundärfollikel genannt, ist die wesentlichste strukturelle Einheit im lymphatischen Gewebe. Er besteht aus einem Lymphozytenwall, der das Keimzentrum (Reaktionszentrum) umgibt. Im Reaktionszentrum befinden sich Germinozyten, Germinoblasten oder Hämozytoblasten (eventuell identisch mit Lymphoblasten), Lymphozyten, Retikulumzellen, Makrophagen und die Zellen der plasmazytären Reihe, wie Plasmoblast, Proplasmazyt und Plasmazelle. Das Gerüst des Lymphfollikels wird vom retikulären Bindegewebe mit seinen pluripotenten Retikulumzellen gebildet (33, 31). Abgesehen vom Thymus, enthalten alle lymphatischen Gewebe von dem Bursa-äquivalent geprägte B-Lymphozyten, von dem Thymus geprägte T-Lymphozyten und vom Knochenmark geprägte O-Lymphozyten; der Thymus besitzt in der Regel nur T-Lymphozyten. B- und T-Lymphozyten sind für das spezifische Abwehrsystem, d.h. das Immunsystem, von großer Bedeutung. So vermitteln antigentragende Makrophagen Sekundärsignale an die B- und T-Lymphozyten. Dabei wirken 2 Subpopulationen von T-Lymphozyten, die Helfer (T_H)- und die Suppressor (T_S)-Zellen, mit. Die T_H -Lymphozyten "sorgen" dafür, daß sich die B-Lymphozyten über die Plasmoblasten in die antikörperbildenden Plasmazellen differenzieren. Andererseits setzen die T_S -Lymphozyten Mediatoren frei, wodurch die Aktivität von B- und T-Lymphozyten sowie Makrophagen gesteigert (Helferfaktor) bzw. unterdrückt (Suppressorfaktor) wird. So kontrollieren die T_S -Zellen die Differenzierung von T-Lymphozyten

in Killer-, Effektor- und Memoryzellen (37).

Schon 1903/04 entdeckte HEINECKE die große Strahlenempfindlichkeit der lymphatischen Gewebe. Diese Empfindlichkeit ist hauptsächlich auf den hohen Anteil an Lymphozyten zurückzuführen. Die große Strahlenempfindlichkeit ist insofern überraschend, als sie nicht dem schon 1906 von BERGONIE und TRIBONDEAU aufgestellten Grundgesetz der Strahlenpathologie folgt. Danach verhält sich die Strahlenempfindlichkeit einer Zelle proportional zu ihrer Teilungsaktivität und umgekehrt proportional zu ihrem Differenzierungsgrad. Lymphozyten können aber schon durch Strahlendosen ≥ 1 cGy (1rd) irreversibel geschädigt werden, obwohl sie sich nur langsam teilen und einen beträchtlichen Differenzierungsgrad aufweisen. Sie sterben also hauptsächlich den "Interphasetod" (81,2). Nach Ganzkörperbestrahlung von Säugetieren kommt es zunächst zu einer Abnahme des Lymphozytengehaltes im Blut, die beim Kaninchen schon nach 10 R feststellbar ist. Die Lymphozytopenie nimmt innerhalb 25-8000 R dosisabhängig zu. Verglichen mit den Zellen der Granulopoese werden die Lymphozyten von Mäusen nach geringeren Strahlendosen abgetötet (5). Nach Bestrahlung mit 50 oder 100 R dauert es nur 15 Minuten, bis die Lymphozytenabnahme einsetzt. Nach 3 Stunden werden die Zelltrümmer von den Phagozyten beseitigt, deren Anzahl 8 Stunden nach Bestrahlung ihr Maximum erreicht hat (33). Nach 24-48 Stunden ist ein Minimum an Lymphozyten erreicht. Nach einer Ganzkörperdosis von 150 R ist schon die Hälfte aller kleinen Lymphozyten in den Lymphknoten

zerstört (5). Die Rückkehr zum normalen Lymphozytengehalt des Blutes verhält sich ebenfalls dosisabhängig. So dauert es etwa 1 Monat, bis sich das Blutbild nach einer Dosis von 100 cGy normalisiert (33, 5).

Nach Ganzkörperbestrahlung entsteht auch eine Granulopenie; diese setzt aber später ein als die Lymphozytopenie, erreicht ihren Tiefstand nach 3-5 Tagen und ist von kürzerer Dauer. Der zeitliche Unterschied ist dadurch zu erklären, daß die reifen Granulozyten (Lebensdauer: 2-8 Tage) (31) relativ strahlenresistent sind, und vorwiegend die Vorläuferzellen der Granulopoese im Knochenmark abgetötet werden, während die reifen Lymphozyten auch nach kleinen Bestrahlungsdosen den Interphasetod sterben (5, 31, 24).

2.2.2. Zytologische Gesichtspunkte

Die hohe Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten ist bereits daran erkennbar, daß man im Lichtmikroskop schon nach einer Dosis um 25 cGy Strahlenschäden und nach Dosen von 25-40 cGy gehäuft Zelltod feststellen kann, der sich u.a. in Mobilitätsverlust, Verlust der Phagozytosefähigkeit und Kernpyknose zeigt (33). Durch Bestrahlung geschädigte Lymphozyten zeigen im Lichtmikroskop vor allem Chromatinverklumpungen und Kernpyknosen. Ab und zu entdeckt man kleine homogene Chromatinschollen, die von einer verdickten Kernmembran umgeben sind. In Lymphozyten von bestrahlten Ratten wurden auch Vakuolen im Zellkern und im

Zytoplasma nachgewiesen. Im Phasenkontrastmikroskop kann man an bestrahlten Milzlymphozyten eine Wellung und Verdickung der Kernmembran feststellen. Elektronenmikroskopisch zeigten sich unmittelbar nach der Bestrahlung mit 300 R Vakuolen im Zellkern, die später den gesamten perinucleären Raum umfaßten. An den Mitochondrien ist erst zu Beginn der Kernpyknose eine geringgradige Schwellung feststellbar. Während nach einer Dosis von 450 R die Lymphknotenlymphozyten von Mäusen vor allem eine Erweiterung des perinucleären Raumes zeigten, waren nach 800 R die Mitochondrien mehr oder weniger verändert; die Ausbuchtungen des endoplasmatischen Retikulums waren deutlich erweitert und im Zytoplasma erschienen Vakuolen und Fettkörperchen. Der Golgi-Apparat kann in zahlreiche helle Bläschen aufgelöst sein. Wenn diese Veränderungen im Zytoplasma auftreten, sieht die Kernstruktur häufig noch normal aus; erst später kommt es zu örtlichen Chromatinverklumpungen (5).

Wie eingangs erwähnt, gibt es Lymphozyten mit unterschiedlicher Funktion. Diese Subpopulationen unterscheiden sich auch in ihrer Strahlenempfindlichkeit. So sind die B-Lymphozyten strahlenempfindlicher als die T-Lymphozyten (ausgenommen eine sehr strahlenempfindliche Subpopulation der T-Lymphozyten) (22).

Noch größere Bedeutung hat die Tatsache, daß die durch eine immunologische Reaktion entstandenen aktivierten Lymphozyten, Lymphoblasten und Plasmazellen weniger strahlenempfindlich sind als die kleinen Lymphozyten (5). Die Zellen

der plasmozytären Reihe widerstanden Dosen bis 800 cGy. Dies führt dazu, daß die Auswirkungen der Ganzkörperbestrahlung auf die Antikörpersynthese von der Dosis und vom Zeitraum zwischen Antigengabe und Strahlenexposition abhängen (33). So reichen subletale Dosen aus, um die Bildung von Antikörpern zu hemmen, wenn die Bestrahlung vor der Antigengabe erfolgt. Wird dagegen 24 Stunden nach der Aktivierung der Lymphozyten bestrahlt, benötigt man eine wesentlich höhere Strahlendosis, um die Immunantwort zu unterdrücken. Erst nach letalen Dosen (700-800 R) entstehen Veränderungen in den Immunoblasten und in den Plasmazellen (5).

Die Makrophagen des lymphatischen Systems, d.h. histiozytäre Retikulumzellen und Histiocyten, haben die Aufgabe, Antigene und Zelltrümmer zu phagozytieren und abzubauen. Nach letalen Strahlendosen (500-800 cGy) sind praktisch alle Lymphozyten, Germinocyten und Germinoblasten zerstört. Die Makrophagen von Milz, Lymphknoten und Thymus lassen lichtmikroskopisch jedoch keine Zellschäden erkennen. Im Elektronenmikroskop kann man geringe und vorübergehende Veränderungen der Kernmembran entdecken. Außerdem sind Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum stark gequollen (5). Das Zytoplasma der Histiocyten ist 30 min p.i. geschwollen und zeigt zahlreiche Pseudopodien. Einige Stunden nach Strahlenexposition beginnen die Makrophagen mit der Phagozytose. Ihre Zellfunktion ist allerdings gestört,

weil der Abbau des phagozytierten Materials verlangsamt ist, die Makrophagen nicht mehr proliferieren können und empfindlicher gegenüber Antigenen reagieren (33).

Lokale Bestrahlung und Ganzkörperbestrahlung bewirken im lymphatischen Gewebe die gleichen Zellveränderungen. Die Repopularisierung aber verläuft unterschiedlich und ist dosisabhängig: 1. Überlebende Lymphozyten können sich lokal vermehren, damit eine echte Regeneration stattfindet, 2. Lymphozyten aus dem Blut können in das lymphatische Gewebe rezirkulieren und 3. Knochenmarkstammzellen können in die lymphatischen Gewebe einwandern. Nach hohen Dosen ist eine Repopularisierung von lokal bestrahltem Gewebe nur über Blutlymphozyten und Knochenmarkstammzellen möglich.

Spätschäden im lymphatischen Gewebe (sie entstehen nach Applikation hoher Strahlendosen), z.B. einer Lokalbestrahlung mit 2850 cGy, zeigen sich nach etwa 14 Tagen in Form von Atrophie mit zunehmender Fibrose und einer Verdickung der Gefäßwände; nach einem Jahr kann es zum vollständigen Ersatz des Lymphknotens durch Bindegewebe kommen. Selbstverständlich sind auch hier die Grade der Fibrosierung von der Bestrahlungsdosis abhängig (5).

2.2.3. Zur Strahlenreaktion des Thymus

2.2.3.1. Biochemische Veränderungen

2.2.3.1.1. Allgemeines

(Übersichten siehe unter Ziffer 2, 3, 13, 36, 67, 71 des Literaturverzeichnis)

Bei Ratten und Mäusen - die umfangreichsten Untersuchungen werden naturgemäß bei diesen Species durchgeführt - kommt es nach Einwirkung ionisierender Strahlung im Dosisbereich von 24 bis über 95 000 cGy^{a)} zu zahlreichen biochemischen Veränderungen. So verliert der Thymus an Gewicht und an DNA. Die Thymozyten enthalten weniger Kalium. In den Mitochondrien ist die ATP-Bildung reduziert. Die Produktion von Laktat und von Fructose-1,6-diphosphat liegt über der Norm, da die ATP-Bildung zurückgeht. Allerdings geht die Phosphorylierung im Kern stärker zurück als in den Mitochondrien. Teilweise werden auch die Proteine des Kerns abgebaut und freigesetzt. Das Chromatin wird verstärkt in Nucleosomen und ihre Oligomeren zerlegt. DNA-Brüche innerhalb des Nucleosoms sind selten. Die DNA wird so zerlegt, als ob DNase I aktiv wäre. Damit nimmt der Gehalt an "freier DNA" oder Desoxyribopolynucleotiden (PDN)^{b)} zu. Der DNA-Verlust ist größer als der RNA-Verlust, da auch weniger DNA synthetisiert wird. Die Desoxyribonucleoproteinfraktion (DNP) wird überdurchschnittlich stark abgebaut. Dadurch kann DNA verstärkt in Lösungen hoher Salzkonzentra-

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

b) Seit 1975 ist bekannt, daß die "freie DNA" nicht frei von Proteinen ist, sondern als DNA-Proteinkomplex aus dem Zellkern freigesetzt wird (95).

tion, in Trichlorazetat, in Säuren oder einfach in Wasser gelöst werden. DNP reagiert auch gegenüber Heparin empfindlicher, sodaß durch Heparinzusatz gleichfalls mehr DNA und Proteine in Lösung gehen. Aber auch die Löslichkeit von DNP selbst nimmt in Salzlösungen zu.

Während des Zellunterganges werden Histone ins Zytoplasma freigesetzt. Die Histone verändern dabei ihre Struktur, weil SH-Gruppen, die an argininreiche Histone gebunden sind, aktiver werden. Auch die RNA- und Proteinsynthese liegen beträchtlich unter der Norm. Während sich die enzymatischen Aktivitäten von Cytochromoxidase, NADPH-Cytochromreduktase und Succinatdehydrogenase nur gering ändern oder gleich bleiben, fallen jene von anderen Krebs-Zyklus-Dehydrogenasen, der Acyl-CoA-Dehydrogenasen und der L-Aminosäure-Oxidase deutlich ab. Soweit untersucht, war nach Strahlenexposition die Gesamtaktivität der DNase II unterschiedlich ausgeprägt, die von RNase und Saurer Phosphatase jedoch erhöht. Die spezifischen Aktivitäten^{a)} von DNase II, RNase, verschiedenen proteolytischen Enzymen, Glycylglycin-Peptidase, Alanin- und Leucyl-aminasen, β -Galactosidase, β -Glucuronidase, Saurer Phosphatase, Phosphoproteinphosphatase sind merklich erhöht. Allerdings stammten 15% der RNase bei der Ratte von außerhalb des Organs.

Bei Strahlendosen von 950 cGy an aufwärts werden einige Enzyme (z.B. die Arylsulfatase) sofort aus zytoplasmatischen Strukturen freigesetzt. Zur Freisetzung der DNase II

a) Unter der spezifischen Aktivität eines Enzyms versteht man seine enzymatische Aktivität pro Gewichtseinheit Protein. Aber auch bei Bezug der enzymatischen Aktivität auf die Gewichtseinheit eines Gewebes oder der DNA wird der Begriff verwendet.

kommt es erst ab hohen Strahlendosen (etwa nach 95 000 cGy). Enzyme der Glykolyse treten vom Kern ins Zytoplasma über. Außerdem entsteht ein Verlust an Pyridinnucleotidcoenzymen (NAD, NADP).

Die Konzentrationen von Cystein und reduziertem Glutathion verringern sich. Es ist weniger Formiat verfügbar.

2.2.3.1.2. Sofortphase (innerhalb 1 Stunde nach Bestrahlung)

Werden Ratten einer Bestrahlung mit Dosen zwischen 24 und 520 000 cGy^{a)} ausgesetzt, kommt es zu folgenden Veränderungen am Thymus:

Insgesamt sinkt der DNA-Gehalt; jedoch bleibt der durchschnittliche DNA-Gehalt pro Zelle konstant.

Der Einbau von Vorstufen in die DNA jeder Zelle ist reduziert. So werden z.B. weniger Phosphat, Thymidin, Adenin, Formiat und Glycin eingebaut. In RNA und Proteine werden gleichfalls weniger Vorstufen eingebaut, wobei jedoch im Vergleich zur DNA der Rückgang weniger drastisch ist.

Im Kern nimmt die Proteinsynthese zu; die Phosphorylierung verringert sich.

Die Chromatinstruktur ist verändert. Geschädigte DNA weist 3'-OH, 5'-OH, 5'-Phosphat und andere Strangbruchenden auf. Somit können mehr "freie DNA" bzw. PDN durch Lösungen hoher Salzkonzentrationen, Säuren, Trichlorazetat aus dem Chromatin herausgelöst werden. Ins Zytoplasma werden Histone, Globuline und glykolytische Enzyme (Aldolase, Lak-

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

tat-Dehydrogenase) freigesetzt. Kalium-Ionen verlassen die Zelle (2, 33).

2.2.3.1.3. Frühphase (1.-3. Stunde nach Bestrahlung)

Nach Bestrahlung mit Dosen im Bereich von 48-950 cGy^{a)} entstehen an den Thymi von Ratten und Mäusen zahlreiche Schäden. So sinkt auch hier der DNA-Gehalt des Organs, während der durchschnittliche DNA-Gehalt pro Zelle konstant bleibt. Die Anzahl der Guanin-Cytosin Paare von PDN ist angestiegen. Bei einigen Enzymen ist die spezifische Aktivität erhöht, so z.B. bei DNase II, ATPase, 5-Nucleotidase, Alkalischer Phosphatase, Nucleosidphosphorylase, Guanase, Adenosinaminohydrolase und der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Nuclease (2, 43). Die Einbaurrate von Thymidin in die DNA ist erniedrigt. In den Mitochondrien gehen die NAD-Synthese und damit auch die oxidative Phosphorylierung zurück. Die Chromatinstruktur ist geschädigt. Die Anzahl der Segmente, in die das Chromatin zerlegt wird, nimmt dosisabhängig zu. Auch in dieser Periode kann mehr "freie DNA" oder PDN durch Lösungen hoher Salzkonzentration, Säuren oder Trichlorazetat aus dem Chromatin herausgelöst werden. Der Gehalt an DNP sinkt ab. (2, 41, 71).

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

2.2.3.1.4. Zwischenphase (2-24 Stunden nach Bestrahlung)

Werden Ratten, Mäuse, Kaninchen, Meerschweinchen oder Hühner mit Dosen im Bereich von 24-4 560 cGy^{a)} bestrahlt, zeigen sich zahlreiche Veränderungen (2, 61, 69).

Der Thymus insgesamt verliert an Gewicht, wobei auch der DNA-Gehalt und die DNA-Konzentration zurückgehen. Der durchschnittliche DNA-Gehalt pro Zelle bleibt bis zu 12 h p.i. unverändert. Danach fällt er ab (2, 22, 43, 80). Die Struktur des Chromatins ist verändert. Die Anzahl der Segmente, in die das Chromatin zerlegt wird, nimmt auch in dieser Periode dosisabhängig zu. Das Chromatin wird in Untereinheiten zerlegt, die denen nach Einwirkung von Mikrokokkennuclease gleichen (2, 71).

Der Chromatin- bzw. DNP-Gehalt sinkt (41).

DNP geht leichter in Lösung, weil es gegenüber Polyanionen (z.B. Heparin, Polypentosanolysulfat, Polyethylensulfat), Desoxycholat und einfachen Salzlösungen empfindlicher wird. Die Löslichkeitsrate ist allerdings pH-abhängig und erreicht ihr Maximum bei pH 10 (13, 36, 41, 62, 63). Durch Lösungen hoher Salzkonzentration, Säuren, Trichlorazetat, Saccharose oder Heparinzusatz kann mehr "freie DNA" oder PDN aus dem Chromatin herausgelöst werden (2, 34, 63, 65, 67, 69).

Im Zytoplasma wird die NAD-Synthese gehemmt. Daher nimmt auch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien ab (2).

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

An den Enzymen fällt die erhöhte spezifische Aktivität der DNase II, der DNase I, ATPase, 5-Nucleotidase, Alkalischen Phosphatase, Nucleosidphosphorylase, Guanase und der Adenosinaminohydrolase auf.

Im Gegensatz dazu ist die spezifische Aktivität der Thymidin-Kinase, der DNA-Polymerase, der Desoxycytidylataminohydrolase, der Thymidylatsynthetase, einer Alkalischen Endonuclease und der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonuclease verringert (2, 25, 79).

Der Einbau von Vorstufen in die DNA, RNA und Proteine ist zurückgegangen. So werden z.B. in die DNA weniger Thymidin, Desoxycytidin und Phosphat und in die RNA weniger Orotat und Phosphat eingebaut. Die Proteine inkorporieren weniger Leucin. Im gesamten Organ liegt die Einbaurrate von Triglyceriden und Azetat über, jene von Palmitat unter dem Normalwert (2). Der Histongehalt des Organs nimmt kontinuierlich ab. Die Histonkonzentration in Thymuskernen liegt bis zur 3. h p.i. über und ab 6 h p.i. unter dem Kontrollwert. Die Abnahme der Histonkonzentration verläuft parallel mit dem Verlust an DNA. Umfang und Dauer der Veränderungen der einzelnen Histonfraktionen sind abhängig von der Strahlendosis (2, 11). Das Chromatin wird in Nucleosomen und ihre Oligomeren zerlegt. Das mittlere Molekulargewicht sowohl der einsträngigen als auch der doppelsträngigen DNA sinkt (25, 34).

Der Gehalt an Guanotin und Uridinmonophosphaten sowie Cytosin und 5-Methyldeoxycytosinderivaten liegt über dem Normalwert, während die Zahl der Guanin-, Uridin- und Thymidin-

derivate abnimmt. Die Menge an Adeninderivaten ändert sich nicht (3).

2.2.3.1.5. Spätphase (1-10 Tage nach Bestrahlung)

Nach Strahlenexposition mit Dosen von 57-2375 cGy^{a)} sind die Thymozyten von Ratten oder Mäusen in vielerlei Hinsicht verändert. Der DNA-Gehalt des Organs zeigt immer noch einen subnormalen Wert. Sowohl die Löslichkeit von DNP in Salzlösungen als auch die Freisetzung von PDN aus dem Chromatin in Salzlösungen ist erhöht (2, 13, 69). Der Einbau von Vorstufen in die DNA bleibt bis einige Tage p.i. unter dem normalen Niveau. Die spezifische Radioaktivität der DNA nach Inkorporation der entsprechend markierten Vorstufen Thymidin, Phosphat, und/oder Desoxycytidin kann 2-3^{1/2} d p.i. erhöht sein. Die Gesamtradioaktivität der DNA liegt erst 10 d p.i. über dem Normalwert (2, 74). Die Aktivität lysosomaler Enzyme erreicht wieder normales Niveau. Am 5. d p.i. normalisieren sich die Aktivitäten der Deoxycytidylataminohydrolase und der Thymidylatsynthetase. Histongehalt und Histonkonzentration erreichen nur subnormale Werte (2, 80). Der Umfang und die Dauer der Veränderungen der einzelnen Histonfraktionen sind abhängig von der Strahlendosis (80).

Der Gehalt an Guanosin- und Uridinmonophosphaten sowie an Cytosin und 5-Methyldeoxycytosinderivaten liegt über dem

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

Normalwert, während die Zahl der Guanin-, Uridin- und Thyminderivate abnimmt. Die Menge an Adeninderivaten ändert sich auch jetzt nicht (3).

2.2.3.2. Histologische Veränderungen

2.2.3.2.1. Allgemeines

Werden Ratten oder Mäuse Röntgendosen zwischen 50 und 100 000 cGy ausgesetzt, so nimmt das Organgewicht ab, der Rindenanteil geht zurück, und der Markanteil nimmt zu. Mäuselymphozyten wandern nach Bestrahlung früher aus als Rattenlymphozyten. Außerdem werden Autolysen der Lymphozyten sichtbar, die allerdings im Mark schneller ablaufen als in der Rinde. Im einzelnen Lymphozyten schreiten die Auflösungsprozesse vom Zytoplasma zum Kern fort. Hier wird die Kernmembran verändert, es kommt zur Pyknose ("Interphasetod"). Selten wird die Mitose gehemmt. Pyknotische Kerne erscheinen in Gruppen und später als in Lymphknoten.

Die Retikulumzellen sterben relativ spät (3-4 d p.i.), bzw. ein Großteil wandelt sich in Makrophagen um, die tote Lymphozyten phagozytieren. Plasmazellen oder daraus differenzierte Lymphoblasten oder durch Phytohämagglutinin stimulierte Lymphozyten sind ebenfalls strahlenresistenter als Lymphozyten. Allerdings ist die primäre Antikörpersynthese genauso strahlenempfindlich wie die Mitosen oder Differenzierungsvorgänge zu Plasmazellen (2, 7, 22, 33).

2.2.3.2.2. Sofortphase (innerhalb 1 Stunde nach Bestrahlung)

Nach Strahlenexposition mit Dosen zwischen 285 und 38 000 cGy^{a)} nimmt das Thymusgewicht ab, während sich der Anteil an Lymphozyten mit Pyknosen erhöht (7, 22, 33).

2.2.3.2.3. Frühphase (1.-3. Stunde nach Bestrahlung)

Nach Bestrahlung mit Dosen von 190 bis 1910 cGy^{a)} waren an Kaninchen, Ratten und Mäusen folgende Beobachtungen zu machen:

Die Zahl der intakten Zellen wird dosis- und zeitabhängig kleiner. Zellteilungsvorgänge hören auf, und das Chromatin ist zu soliden Massen zusammengeklumpt. In den Lymphozyten nehmen die Nucleolen an Größe zu, die Ribosomen werden abgebaut, so daß sogar ribosomenfreie Areale entstehen; die Mitochondrien zeigen Defekte an Innen- und/oder Außenmembranen oder Vakuolenbildung (7, 22, 33).

Die Anzahl der Zellfragmente (apoptotische Körperchen) vergrößert sich dosis- und zeitabhängig.

2.2.3.2.4. Zwischenphase (2-24 Stunden nach Bestrahlung)

Die Thymi von Kaninchen, Ratten und Mäusen, die Strahledosen zwischen 48 und 38 000 cGy^{a)} ausgesetzt werden, zeigen charakteristische Veränderungen. So nehmen das Organgewicht und die Zellzahl ab, da viele Zellen auswandern. Die Zellkonzentration geht zurück, weil der Mark- und Bindegewebeanteil dosisabhängig zunehmen, während sich

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

der Rindenanteil verkleinert. Die Zellpopulation des Organs ändert sich. Pyknotische Lymphozyten sind vermehrt in der Zelluntergangsphase, d.h. 3-8 h p.i., zu sehen. Die Zahl der pyknotischen Kerne, die vorzugsweise in Gruppen erscheinen, ist - bezogen auf 1 Gramm Gewebe - höher als normal. Dabei kann der Prozentsatz intakter Zellen dosisabhängig bis auf 0% zurückgehen.

Die Anzahl der Zellfragmente (apoptotische Körperchen) vergrößert sich dosis- und zeitabhängig.

Die Kerne der Lymphozyten werden aber nicht nur pyknotisch, sie zeigen vielmehr auch Vakuolen zwischen ihren Membranen, Kernwandhyperchromatose und vergrößerte Nucleolen. Die Ribosomen werden abgebaut, so daß auch ribosomenfreie Areale entstehen; ebenso die Mitochondrien, die defekte Außenmembranen, gequollene Innenmembranen oder Vakuolenbildung aufweisen.

Im Mark erhöht sich die Zahl der lymphoiden Retikulumzellen, von denen sich wiederum viele in Makrophagen umwandeln. In den Makrophagen fällt die größere Lysosomenzahl auf; es werden zahlreiche Zytolysosomen gebildet.

Die Verteilung der Enzyme innerhalb der Zelle ändert sich. Im Mark wird der Höhepunkt der Phagozytoseaktivität früher erreicht als in der Rinde, d.h. nach 8 bzw. 12 h p.i.. Zelltrümmer werden vorwiegend in einer Reinigungsphase (8-48 h p.i.) von strahlenresistenteren Retikulumzellen und Makrophagen phagozytiert (2, 7, 22).

2.2.3.2.5. Spätphase (1-10 Tage nach Bestrahlung)

Nach Strahlenexposition mit Dosen zwischen 48 und 950 cGy^{a)} entstehen bei Kaninchen, Ratten und Mäusen folgende Veränderungen:

Am Anfang dieser Phase setzten sich die Reaktionen der Zwischenphase fort: Das Organgewicht wird kleiner und der Anteil des Marks und des Bindegewebes nimmt zu. Nachdem die toten Lymphozyten (hauptsächlich die der Rinde) durch Makrophagen beseitigt wurden (2 d p.i.), erscheinen wieder monozytische Lymphoblasten (4 d p.i.) und reife Thymozyten (5 d p.i.).

In der Repopulationsphase wandern Lymphozyten vom Mark in die Rinde und füllen diese wieder auf. Die Retikulumzellen verlieren ihr epitheliales Aussehen, und die Hasall'schen Körperchen bilden sich wieder (2, 22, 33).

2.2.4. Zur Strahlenreaktion der Milz

2.2.4.1. Biochemische Veränderungen

2.2.4.1.1. Allgemeines

(Übersichten siehe unter Ziffer 2, 3, 13, 36, 67, 71 des Literaturverzeichnisses)

Nach Röntgenbestrahlung von Ratten und Mäusen mit Dosen zwischen 95 und 95 000 cGy^{a)} kommt es zu folgenden Schäden und Veränderungen:

Sowohl das Gewicht als auch der DNA-Gehalt des Organs gehen zurück. Der Zellgehalt an Formiat, Folsäure, Cystein,

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

reduziertem Glutathion und Kalium ist herabgesetzt. Die Lysosomen werden "zerbrechlicher". Die oxydative Phosphorylierung geht im Zellkern stärker zurück als in den Mitochondrien; daher sinkt der ATP-Spiegel. Während die Aktivität der an argininreiche Histone gebundenen SH-Gruppen größer wird (mit Strukturveränderungen der Histone), nimmt sie bei den SH-Komponenten der Nichtproteine ab.

Der Kern verliert Natrium- und Kalium-Ionen. Die Proteine des Kerns werden teilweise abgebaut und freigesetzt. So werden z.B. Histone ins Zytoplasma freigesetzt, sobald Kernpyknosen entstehen.

Durch den Abbau von Chromatin entstehen Nucleosomen und ihre Oligomeren. Intranucleosomale DNA-Brüche sind selten. Daher kann durch Lösungen hoher Salzkonzentration, durch Trichlorazetat, durch Säuren und/oder durch Heparinzusatz mehr "freie DNA" aus dem Chromatin herausgelöst werden. Es wird weniger DNA synthetisiert. Die Lymphozyten verlieren mehr DNA als RNA.

Die Zahl der säurelöslichen Ribonucleotide steigt; gleichzeitig ist der Einbau von Vorstufen in die RNA und Proteine gedrosselt.

Während sich die enzymatischen Aktivitäten von Cytochrom-oxidase, NADPH-Cytochromreduktase und Succinatdehydrogenase nur gering ändern oder gleich bleiben, fallen jene von anderen Krebs-Zyklus-Dehydrogenasen, der Acyl-CoA-Dehydrogenasen und der L-Aminosäureoxidase deutlich ab. Es wird weniger Zitronensäure synthetisiert.

Soweit untersucht, war nach Strahlenexposition die Gesamtaktivität der DNase II unterschiedlich ausgeprägt, die von RNase und Saurer Phosphatase jedoch erhöht. Die spezifischen Aktivitäten von DNase II, RNase, verschiedenen proteolytischen Enzymen, Glycylglycin-Peptidase, Alanyl- und Leucylaminasen, β -Galactosidase, β -Glucuronidase, Saurer Phosphatase, Phosphoproteinphosphatase sind merklich erhöht.

Aus dem Kern entweichen glykolytische Enzyme ins Zytoplasma. Auch die Werte für die Pyridinnucleotidcoenzyme (NAD, NADH) und die NAD(P) Nucleosidase-Aktivität liegen unter den Normalwerten. Nach Bestrahlungsdosen mit mindestens 950 cGy^{a)} werden bestimmte Enzyme sofort freigesetzt (z.B. die Arylsulfatase) (2).

2.2.4.1.2. Sofortphase (innerhalb 1 Stunde nach Bestrahlung)

Werden Ratten einer Ganzkörperbestrahlung mit Dosen zwischen 24 und 2375 cGy^{a)} ausgesetzt, sind an der Milz folgende Abweichungen von der Norm festzustellen:

Der DNA-Gehalt nimmt dosisabhängig ab, wobei jedoch der durchschnittliche DNA-Gehalt pro Zelle konstant bleibt.

Der Einbau von Vorstufen in die DNA jeder Zelle ist reduziert. So werden z.B. weniger Phosphat, Thymidin, Adenin, Formiat und Glycin eingebaut. Es wird weniger DNA synthetisiert. In RNA und Proteine werden gleichermaßen weniger Vorstufen eingebaut.

Die Chromatinstruktur ist geschädigt. Daher können mehr

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

"freie DNA" oder PDN durch Lösungen hoher Salzkonzentration, Säuren oder Trichlorazetat aus dem Chromatin herausgelöst werden. Ins Zytoplasma werden Histone, Globuline und glykolytische Enzyme (Aldolase, Laktat-Dehydrogenase) freigesetzt. Kalium-Ionen verlassen die Zelle. Im Kern nehmen die Synthese von Proteinen zu und die Phosphorylierung ab. Der Gehalt an reduziertem Glutathion vermindert sich unmittelbar nach Exposition (2, 74).

2.2.4.1.3. Frühphase (1.-3. Stunde nach Bestrahlung)

Werden Ratten oder Mäuse in vivo mit Röntgendosen zwischen 48 und 95 cGy^{a)} bestrahlt, ist mit folgenden Veränderungen zu rechnen:

Der DNA-Gehalt nimmt dosisabhängig ab, wobei jedoch der durchschnittliche DNA-Gehalt pro Zelle konstant bleibt.

Der Einbau von Thymidin in die DNA ist reduziert.

Die Chromatinstruktur ist geschädigt.

Die Anzahl der Segmente, in die das Chromatin zerlegt wird, nimmt dosisabhängig zu. Daher können auch in dieser Phase mehr "freie DNA" oder PDN durch Lösungen hoher Salzkonzentration, Säuren, Trichlorazetat oder Heparinzusatz aus dem Chromatin herausgelöst werden.

Der Gehalt an DNP sinkt ab. Dies kann ebenso wie der Anstieg des Gehaltes an "freier DNA" durch hypoxische Hypothermie verzögert werden.

Bei folgenden Enzymen liegt die spezifische Aktivität über dem Normalwert: DNase II, ATPase, 5-Nucleotidase, Alkali-

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

scher Phosphatase, Nucleosidphosphorylase, Guanase, Adenosinaminohydrolase und der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Nuclease. In den Mitochondrien kommt es zu einem Abfall der oxydativen Phosphorylierung (2, 41, 71, 72).

2.2.4.1.4. Zwischenphase (2-24 Stunden nach Bestrahlung)

Folgende Veränderungen waren nachweisbar, sobald Ratten, Mäuse, Kaninchen, Meerschweinchen und Hühner in vivo mit Dosen zwischen 29 und 4560 cGy^{a)} bestrahlt worden waren (2, 61, 69):

Die Milz verliert Gewicht und enthält weniger DNA als vorher, obwohl der durchschnittliche DNA-Gehalt pro Zelle bis zu 12 h p.i. sich nicht ändert; danach fällt er ab (2, 80, 22, 43).

Der Einbau von DNA-Vorstufen, wie z.B. Thymidin, ist zurückgegangen. Ebenfalls reduziert ist der Einbau von Vorstufen in die RNA und in Proteine (Kernproteine nehmen weniger Leucin auf). Die Konzentration von Histidin, Tyrosin, Tryptophan, Valin, Taurin und Cystin liegt über dem Normalwert (2).

Die Struktur des Chromatins ist verändert.

Die Anzahl der Segmente, in die das Chromatin zerlegt wird, nimmt dosisabhängig zu. Das Chromatin wird in Untereinheiten zerlegt, die denen nach Einwirkung von Mikrokokkennuclease gleichen (2, 71). Der Chromatin- oder DNP-Gehalt sinkt, DNP geht leichter in Lösung, weil es gegenüber Polyanionen

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

(z.B. Heparin, Polypentosesulfat, Polyethylensulfat) Desoxycholat und einfachen Salzlösungen empfindlicher wird.

Die Löslichkeitsrate ist pH-Wert-abhängig und erreicht ihr Maximum bei pH 10 (13, 36, 41, 62, 63).

Durch Lösungen hoher Salzkonzentration, Säuren, Trichlorazetat, Saccharose oder Heparinzusatz kann mehr "freie DNA" oder PDN aus dem Chromatin herausgelöst werden (2, 34, 63, 65, 67, 69).

In den Mitochondrien liegt das Ausmaß der oxydativen Phosphorylierung unter dem Normalwert (2). Im Kern kommt es zu einem Abfall sowohl des relativen Histongehaltes als auch des relativen Nicht-Histon-Proteingehaltes. Histone und Globuline werden aus dem Zellkern in das Zytoplasma freigesetzt. Die Zusammensetzung spezifischer Histone hat sich geändert (2, 11).

Der Gehalt an Cytosin-, 5-Methyldeoxycytosin- und Uracilderivaten liegt über dem Normalwert, während die Zahl der Guaninderivate abnimmt. Die Menge an Thymidinderivaten ist nahezu unverändert (97).

2.2.4.1.5. Spätphase (1-10 Tage nach Bestrahlung)

Werden Ratten und Mäuse einer Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis zwischen 57 und 2375 cGy^{a)} ausgesetzt, so ändert sich die Zusammensetzung folgender Parameter (13, 69):

Der anfänglich noch erniedrigte DNA-Gehalt nähert sich allmählich wieder dem Normalwert. Der Einbau von Vorstufen in

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

die DNA bleibt bis einige Tage p.i. unter dem normalen Niveau. Jedoch ist die spezifische Aktivität der DNA nach Inkorporation von Thymidin nach $1\frac{1}{2}$ d p.i., von Phosphat nach $2\frac{1}{2}$ d p.i. und von Desoxycytidin nach $3\frac{1}{2}$ d p.i. erhöht.

Die Gesamt-Radioaktivität der DNA bleibt unter dem Normalwert (2, 74).

Die RNA-Synthese steigt 2 d p.i. schon wieder an.

Die Phospholipide nehmen vermehrt Phosphor auf.

Sowohl die Löslichkeit von DNP in Salzlösungen als auch die Freisetzung von PDN aus dem Chromatin in Salzlösungen ist erhöht (13, 69).

Die Aktivität der DNase II liegt über dem Normalwert, während die spezifische Aktivität der Aminotransferase abnimmt. Histone und Globuline werden aus dem Zellkern in das Zytoplasma freigesetzt. Die Zusammensetzung spezifischer Histone hat sich geändert (2, 74).

Der Gehalt an Cytosin-, 5-Methyldeoxycytosin- und Uracil-derivaten liegt über dem Normalwert, während die Zahl der Guaninderivate abnimmt. Die Menge an Thymidinderivaten ist nahezu unverändert (97),

2.2.4.2. Histologische Veränderungen

2.2.4.2.1. Allgemeines

Werden Ratten und andere Labortiere einer Bestrahlung mit Dosen zwischen 19 und 950 cGy^{a)} ausgesetzt, so ergeben

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

sich zahlreiche Veränderungen.

Das gesamte Organ verliert an Gewicht und an Größe, weil die Zellzahl abnimmt. Die rote Pulpa ist strahlenresistenter als die weiße Pulpa. An den Follikelzellen ist eine Fernwirkung festzustellen, wenn nur Kopf und Extremitäten exponiert werden oder bei bleigeschützter Milz bestrahlt wird. In den Follikeln kommt es zu Proliferation und Schädigung der Follikelstruktur. Mittelgroße, kleine sowie blastische und lymphatische Retikulumzellen sterben in der Interphase. Die Plasmazellen werden in ihrer Entwicklung gehemmt, sie "altern" schneller, und die Bildung von Antikörpern geht zurück, weil die primäre Antikörpersynthese fast genauso strahlenempfindlich ist wie die Mitosen oder Differenzierungsvorgänge zu Plasmazellen. Andererseits sind Plasmazellen oder daraus differenzierte Lymphoblasten oder durch Phytohämagglutinin stimulierte Lymphozyten oder Retikulumzellen strahlenresistenter als Lymphozyten. In den Lymphozyten verlagert sich das Chromatin, die Kernmembran ist dicker, die Kernvakuolen und die Nucleolen treten deutlicher hervor; multinucleoläre Lymphozyten überwiegen. Die Mitochondrien sind größer, wobei ihre Anzahl sinkt. In den lymphatischen Retikulumzellen und basophilen Stammzellen kommt es zu einer Verlagerung des Chromatins an die Kernmembran oder es entsteht eine fein-granulierte Kernstruktur. Bei den aktivierten Retikulumzellen wird das Chromatin nur vorübergehend an die Kernmembran verlagert. Die Nucleolen nehmen an Zahl und Größe zu. Das Plasma wird

breiter, und die Anzahl der Granula steigt (oft phagozytisierte Zelltrümmer). Die fadenförmigen Mitochondrien sind oft vermehrt. Die Phagozytosefähigkeit wird dosisabhängig kleiner. Die Erythroblasten gehen durch Karyorhexis zugrunde. Die Bildung von ektopischem Knochenmark ist möglich (2, 74).

2.2.4.2.2. Sofortphase (innerhalb 1 Stunde nach Bestrahlung)

Bei Kaninchen und Ratten werden nach Strahlenexposition mit einer Dosis von 500 cGy^{a)} alle Mitosen gehemmt. (33).

2.2.4.2.3. Frühphase (1.-3. Stunde nach Bestrahlung)

Nach Strahlenexposition mit Dosen zwischen 95 und 760 cGy^{a)} kommt es bei Ratten, Mäusen und anderen Labortieren zu zahlreichen Veränderungen. Der größte Teil der Follikellymphozyten ist zerstört. Die mittelgroßen Lymphozyten verschwinden vollständig. Wenige blastische und lymphatische Retikulumzellen, basophile Stammzellen und einzelne Lymphozyten bleiben übrig. In den Lymphozyten entstehen Kernverdichtungen und Chromatinverlagerungen an die Kernmembran; die Nucleolen sind oft größer, und die zytoplasmatische Lamelle der Kernmembran ist zum Teil abgehoben. Das Chromatin wird umgeordnet; es entstehen Karyolysen. Außerdem sind die Mitochondrien vergrößert. An den Retikulumzellen fällt auf, daß die Nucleolenstruktur aufgelockert und die Kernmembran zum Teil erweitert sind. Die Mitochondrien sind zum Teil vermehrt und haben längliche Gestalt. Die Anzahl der Cristae

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

geht zurück, und der Abstand der inneren Doppelmembran wird unregelmäßig (33, 74).

2.2.4.2.4. Zwischenphase (2-24 Stunden nach Bestrahlung)

Wenn Ratten, Kaninchen und andere Labortiere mit Dosen im Bereich von 500-760 cGy^{a)} bestrahlt werden, können folgende Reaktionen nachgewiesen werden:

Das Organ wird kleiner. Es entsteht eine andere Zellpopulation. Die Lymphozyten werden zerstört. Es entstehen Chromatinverklumpungen, Kernpyknose, Fragmentation und Verdickung oder Auflösung der Kernmembran. Mehr Granulozyten und epitheloide Retikulumzellen sind vorhanden. Die resistenteren Retikulumzellen und Makrophagen, die mehr Lysosomen enthalten als die Lymphozyten, beginnen die toten Zellen und die Zelltrümmer zu phagozytieren. Das weiße Mark zwischen den vergrößerten Retikulumzellen enthält zahlreiche Phagozyten (mit Zelltrümmern beladen) und basophile Zellen der plasmazytären Reihe; im roten Mark befinden sich nur noch Retikulumzellen und Erythrozyten. In den Makrophagen steigt die Zahl der Lysosomen, Zytolysosomen werden gebildet und die Verteilung der Enzyme in den subzellulären Fraktionen ändert sich, da Enzyme aus den subzellulären Partikeln freigesetzt werden. DNase II und Saure Phosphatase sind in den Makrophagen vorhanden. An den Plasmazellen fällt auf, daß das endoplasmatische Retikulum größer wird, endoplasmatische Membranen sich auflösen und Innenräume zusammenfließen (2, 33, 74).

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

2.2.4.2.5. Spätphase (1-10 Tage nach Bestrahlung)

Nach Bestrahlung von Ratten, Kaninchen und anderen Labor-tieren mit Dosen im Bereich zwischen 380 und 760 cGy^{a)} waren folgende Beobachtungen zu machen:

Die Milz wird kleiner, und das Gewicht geht auf 20-30% des Ausgangswertes zurück. Die toten Zellen sind abgebaut. Die Zahl der Mast- und Plasmazellen wächst, während Erythroblasten, Myelozyten und Megakaryozyten nicht mehr vorhanden sind. Zwischen den wenigen Lymphozyten, kleinen lymphoiden Retikulumzellen und größeren Retikulumzellen befinden sich wenige lymphatische Retikulumzellen und basophile Stammzellen. Bei den überlebenden Lymphozyten treten die Kerne und Nucleolen deutlicher hervor. Die fast entleerten Follikel werden wieder aufgebaut (33, 74).

2.3. Zum Mechanismus des Interphasetodes am Beispiel der Lymphozyten

Jede teilungsaktive Zelle durchläuft einen Zellzyklus, der in zwei Hauptabschnitte unterteilt wird, nämlich in die Mitose (M) und in die Interphase. Der Zeitabschnitt zwischen zwei Zellteilungen (Mitosen) wird Interphase genannt. Diese untergliedert sich in die Wachstumsphase G_0 , die Wachstumsphase G_1 , die DNA-Synthesephase S und die Wachstumsphase G_2 . Abgekürzt lauten die Phasen des Zellzyklus - M - G_0 - G_1 - S - G_2 - M - (31).

a) Ionendosiswerte wurden in Energiedosiswerte umgerechnet

Der Begriff Interphasetod sagt nur etwas über die Zyklusphase aus, in der sich eine Zelle zum Zeitpunkt ihres Todes gerade befindet, nicht aber über dabei entstandene morphologische und biochemische Veränderungen.

Histomorphologisch können an Zellen zwei Formen des Todes unterschieden werden, die Nekrose und die Apoptose. Wenn Zellen abgestorben sind, setzen autolytische Vorgänge ein, die zu charakteristischen Veränderungen an den toten Zellen führen. Diese veränderten toten Zellen werden Nekrose genannt (54). Bei der Nekrose kommt es zu Veränderungen am Kern (Kernwandhyperchromatose, Pyknose, Karyorhexis, Karyolysis) und am Zytoplasma (Koagulation, Kolliquation) (54, 56).

Von den Lymphozyten weiß man, daß sie nach irreversibler Schädigung z.B. durch ionisierende Strahlen dem Interphasetod - im angloamerikanischen Schrifttum auch "intermitotic death" genannt - unterliegen; Zelluntergang in der Mitosephase spielt bei den sich relativ selten teilenden Lymphozyten eine untergeordnete Rolle (2).

Beim Interphasetod entsprechen die histomorphologischen Veränderungen denen der Apoptose (46). Die Apoptose ist eine Art programmierter Zelltod, der einen aktiven Selbstzerstörungsprozeß darstellt. Dieser hat wahrscheinlich eine der Mitose entgegengesetzte Aufgabe. Mitose und Apoptose haben aber vermutlich zwei Gemeinsamkeiten. Bei beiden wird die Kernmatrix umstrukturiert, und sie kommen sehr häufig in Zellen vor, die eine weniger gut entwickelte Kernmatrix

besitzen. Die Apoptose tritt sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Verhältnissen auf (45, 75). Sie verläuft in zwei Phasen. Während der ersten Phase kondensiert des Zytoplasma der Zelle und bildet Ausbuchtungen. Der Kern wird pyknotisch und karyorhektisch. Diese Phase wird durch den Zerfall der Zelle in viele apoptotische Körperchen abgeschlossen. In der zweiten Phase werden diese von Phagozyten aufgenommen und verdaut.

Nach Röntgenbestrahlung von Thymozyten in vivo sind beide Phasen der Apoptose zu erkennen, während nach in vitro Bestrahlung die Apoptose nur bis zur Zellkondensation voranschreitet: Die Thymozyten nehmen ungefähr 30% an Volumen ab, besitzen normalen DNA-Inhalt, zerfallen aber nicht in Fragmente. Bei in vivo-Versuchen werden die Zellfragmente dosis- und zeitabhängig kleiner und damit zahlreicher. Allerdings besitzen die meisten Thymozytenfragmente nahezu die gleiche absolute DNA-Menge. Bei der Zellfragmentation entstehen somit bezüglich Größe heterogene Zellfragmente mit nahezu gleichem DNA-Inhalt (46).

Es wird angenommen, daß die Retikulumzellen bei der Zellfragmentation eine Schlüsselrolle spielen, weil Thymozyten dort häufiger zerfallen, wo sie von Retikulumzellen umgeben sind (46).

Jeder Veränderung innerhalb der Zelle, die mit dem Lichtmikroskop, Elektronenmikroskop oder Scanning-Elektronen-Mikroskop erfaßt wird, gehen biochemische Prozesse voraus. Von diesen seien nur jene erwähnt, die zu einer Schädigung

der DNA-Struktur führen.

Aus Rattenthymozyten läßt sich z.B. nach Röntgenbestrahlung in vivo mehr Chromatin, d.h. "freie DNA" und Proteine, herauslösen. Diese Zerlegung des Chromatins (DNA und Histone) erfolgt zwischen den Nucleosomen, wobei DNA-Segmente mit 3'-OH-Enden entstehen (61, 69, 75). Welche Enzyme dabei beteiligt sind, ist noch nicht endgültig geklärt. So diskutiert man die Beteiligung einer Ca/Mg-abhängigen Endonuclease oder einer alkalischen Endonuclease, die in vitro oligonucleosomale DNA erzeugt (75). Für die Proteolyse scheint eine Protease verantwortlich zu sein, die in vitro ihre optimale Aktivität zwischen pH 7 und pH 9 zeigt. Insgesamt entfaltet das enzymatische System für die Selbstverdauung des Chromatins seine optimale Aktivität also im neutralen oder leicht alkalischen Milieu. Andererseits gibt es auch saure Endonucleasen (ähnlich der DNase II), die die Chromatin-DNA in vitro in oligonucleosomale DNA-Segmente mit 5'-OH-Enden zerlegen; auch sollen saure Endonucleasen aus den Lysosomen der Histiozyten an der Verdauung der apoptotischen Körperchen in vivo beteiligt sein (75). Nach ionisierender Bestrahlung in vivo zeigt sich bei rund 95% der Thymus-, 70% der Milz-, 80% der Knochenmarkszellen und in sehr seltenen Fällen an Hepatozyten eine Apoptose. Vergleicht man die Kernstruktur dieser Zellarten, kommt man zu dem Schluß, daß Apoptose vor allem bei jenen Zellen entsteht, die entweder einen weniger dichten Kern besitzen, oder deren Kern durch Umstrukturierung aufgelockerter ge-

worden ist. Diese Kernstrukturen erleichtern den Endonucleasen den Zugang zur DNA und damit deren Abbau zu Oligomeren (75). Andererseits kann die aktive Selbstzerstörung nach Bestrahlung in vitro bei allen Geweben beobachtet werden, wenn die Zellen und Zellkerne im Zuckermedium von niedriger Ionenstärke inkubiert werden ($\leq 2 \text{ mmol Mg}^{2+}/\text{l}$ oder $\leq 1 \text{ mmol Ca}^{2+}/\text{l}$).

Im Gegensatz dazu gibt es auch Substanzen, die eine Auflockerung der Kerne von bestrahlten lymphatischen Zellen verhindern. Dies sind z.B. Agmatin, Spermidin, Na^+ und Ca^{2+} . Eine Stufe weiter gehen zweiwertige Kationen in gewissen Konzentrationen, die sogar eine Kontraktion ganzer Kerne bewirken (75).

Am Beispiel menschlicher Lymphozyten verweisen CARSON et al. (9) jüngst auf eine enge Beziehung zwischen DNA-Einzelstrangbrüchen, NAD-Stoffwechsel und Lebensfähigkeit von Zellen: Bei ruhenden Lymphozyten besteht unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen dem kontinuierlichen und spontanen Auftreten von Strangbrüchen und Bruchreparatur. Dieser stetig ablaufende DNA-Reparaturprozeß wird von einem der Reparaturrate proportionalen NAD-Verbrauch bei gleichzeitiger Synthese von Poly(ADP-ribose) (s. dazu auch Teil 5.2.4. der Arbeit) aus NAD begleitet, wobei zu berücksichtigen ist, daß Lymphozyten (hohes Zellkern-Plasma-Verhältnis) nur eine begrenzte Kapazität zur Poly(ADP-ribose)-Synthese aus NAD besitzen. Erhöht sich - etwa nach Einwirkung ionisierender Strahlen -

die DNA-Bruchrate und/oder verlangsamt sich die DNA-Reparatur, beschleunigt sich gleichzeitig die Poly(ADP-ribose)-Bildung unter NAD- (und ATP-) Verlust. Kann diese Störung im Energiestoffwechsel nicht ausgeglichen werden, wird

- in einer auf molekularer Ebene noch nicht geklärten Weise -

die Apoptose eingeleitet, deren Sinn darin gesehen wird, daß die "Konservierung" von Zellen mit nichtreparierten DNA-Schäden auf ein Minimum reduziert wird.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Reagentien und Tiermaterial

3.1.1. Reagentien und Lösungen

3-Aminobenzamid

SIGMA, Taufkirchen, Nr. A-0788

1-β-D-Arabinofuranosylcytosin (araC)

SIGMA, Taufkirchen, Nr. C - 1768

Bisbenzimid

CALBIOCHEM, Frankfurt a.M., Nr. 382061

Desoxyribonucleinsäure (DNA)

Na-Salz der DNA aus Kälberthymus

MW $8,9 \times 10^6$, mind. 95% DNA

EGA-Chemie, Steinheim, Nr. 16, 820-3

Diäthyläther, reinst

MERCK, Darmstadt, Nr. 923

3', 5'- Dideoxythymidin (ddT)

SIGMA, Taufkirchen, Nr. D - 1138

EDTA-Na₂ - Salz

Äthylendiamintetraessigsäure-Na₂-Salz p.A.

SERVA, Heidelberg, Nr. 11280

Ethidiumbromid (EB)

2,7-Diamino-10-äthyl-9-phenylphenanthridium·bromid

SERVA, Heidelberg, Nr. 21238

D(+)-Glucose (Monohydrat)

MERCK, Darmstadt, Nr. 8342

HANKS-Lösung

(Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺-frei)

1 l wäßrige Lösung enthielt:

NaCl 136,9 mmol/l

Na₂HPO₄ 0,33 mmol/l

KCl 5,36 mmol/l

KH₂PO₄ 0,36 mmol/l

D(+)-Glucose 5,55 mmol/l

Zu 1 l dieser Lösung wurden 25 ml einer wäßrigen NaHCO₃-Lösung (167 mmol/l gegeben und die gesamte Lösung mit HCl (1 mol/l) auf pH=7,4 eingestellt.

Kaliumchlorid

KCl

MERCK, Darmstadt, Nr. 4936

Kaliumdihydrogenphosphat

KH₂PO₄

MERCK, Darmstadt, Nr. 4871

Lyse-Lösung für die Nucleoidsedimentation

1 l wäßrige Lösung enthielt:

NaCl 1,5 mol/l

EDTA-Na₂ 0,1 mol/l

Triton X-100 0,7% (V/V)

pH-Wert-Einstellung mit NaOH (1 mol/l) auf pH=8,0

Natriumchlorid

NaCl

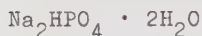
MERCK, Darmstadt, Nr. 6404

Natriumhydrogencarbonat



MERCK, Darmstadt, Nr. 6329 E

Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat



MERCK, Darmstadt, Nr. 6580

Natronlauge



hergestellt aus Titrisol^R

400g NaOH für 1 l Natronlauge (1 mol/l)

MERCK, Darmstadt, Nr. 9959

Novobiocin

SIGMA, Taufkirchen, Nr. N-1628

Perchlorsäure, 70%



MERCK, Darmstadt, Nr. 519

Protease (Proteinase K)

von Tritirachium album Typ XI

SIGMA, Taufkirchen, Nr. P-0390

Saccharose

zur Dichtegradientenzentrifugation

MERCK, Darmstadt, Nr. 7654

Salzsäure, rauchend 37%



MERCK, Darmstadt, Nr. 317

Stammlösung für den Saccharosegradienten

1 l wäßrige Lösung enthielt:

NaCl 1,5 mol/l

Tris-Puffer 0,02 mol/l

EDTA·Na₂ 1 mmol/l

Ethidiumbromid 76,08 µmol/l

Aus dieser Lösung wurde eine 15- bzw. 30- prozentige (g/g) Saccharoselösung hergestellt. pH-Wert-Einstellung mit rauchender HCl auf pH=8,0.

Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)

Puffersubstanz

MERCK, Darmstadt, Nr. 8382

Triton X-100

nichtionisches Detergens

Octylphenol-polyäthylenglycoläther

SERVA, Heidelberg, Nr. 37240

TÜRKES-Lösung

(Essigsäure-Gentianaviolettlösung)

zur Leukozytenzählung

MERCK, Darmstadt, Nr. 9277

Herstellung des Gradienten:

Für einen Zentrifugenlauf wurden in 6 Zellulosehülsen (KONTRON Cellulose-Tubes HT, Volumen ca. 10 ml) lineare Saccharosegradienten (Saccharoselösung 15-30%) hergestellt. Hierzu diente ein Gradientenmischer (TEGIMENTA AG, Rotkreuz, Schweiz), mit dem die Zellulosehülsen bis zu einem Abstand von 10 mm vom oberen Rand gefüllt wurden. Zur Festigung wurde der Gradient etwa 15 h bei 4°C in einer Kühlzelle aufbewahrt.

3.1.2. Tiermaterial und Tierhaltung

Die Versuche wurden vorwiegend mit weiblichen 150-260g schweren, ca. 3 Monaten alten Wistar-Ratten durchgeführt. Bei einigen in vivo-Versuchen wurden männliche Wistar-Ratten verwendet. Alle Tiere stammten aus institutseigener konventioneller Zucht und wurden zu je 2-6 in Makrolonkäfigen (nach FISCHER und GÖNNERT; 15 x 21 x 37 cm) bei Raumtemperaturen zwischen 22-24°C gehalten.

Altromin^R-Preßfutter (ALTROGGE Kraftfutter GmbH, Lage, Lippe) und Wasser standen für die Ratten ad libitum zur Verfügung.

3.2. Behandlung der Tiere

3.2.1. Röntgenbestrahlungen

Pro in vivo-Versuch wurden 2 etwa gleich schwere Ratten verwendet. Nach Feststellung ihres Körpergewichtes

wurde zuerst das Kontrolltier scheinbestrahlt; anschließend wurde die andere Ratte ganzkörperbestrahlt. Sie wurde hierzu in einen oben offenen Glaszylinder (ϕ 20 cm) gesetzt und mit einem in der Höhe verstellbaren Drahtnetz schonend fixiert. Der Abstand Focus - Tier betrug durchschnittlich 20 cm. Die Energiedosisleistung belief sich bei eingeschaltetem Röntgengerät auf 0,76 Gy/min. Als Bestrahlungsquelle diente der Kristalloflex 4 der Firma SIEMENS und HALSKE, Erlangen. Technische Daten:

Scheitelspannung: 60 kV

Stromstärke : 30 mA

Halbwertschicht : 0,16 mm Cu

Filterung : 0,16 mm Cu

3.2.2. Aufarbeitung der Tiere

Die Tiere wurden einzeln in einen oben offenen Glaszylinder gesetzt, in welchem ein mit Diäthyläther getränkter Zellstoffbausch lag. Das Glasgefäß wurde mit einer Glasplatte abgedichtet und solange geschlossen gehalten, bis die Tiere leicht narkotisiert waren. Anschließend wurden die Ratten dekapitiert und entblutet; die gewünschten Organe wurden entnommen. Die scheinbestrahlte Kontrollratte wurde immer zuerst aufgearbeitet.

Bei in vitro-Versuchen fand vor der Aufbereitung der Tiere keine Ganzkörperbestrahlung statt.

3.3. Versuchsablauf

3.3.1. Gewinnung der Zellen aus Thymus und Milz

Die Herstellung einer Zellsuspension aus Thymus und Milz erfolgte unter nahezu identischen Bedingungen. Die Organe wurden aus dem gut entbluteten Tier entnommen und getrennt in mit kalter HANKS-Lösung zur Hälfte gefüllte Petrischalen gelegt, gewaschen und von organfremden Gewebsresten (z.B. Lymphknoten am Thymus) gesäubert. Die so gereinigten Organe wurden nunmehr in anderen Petrischalen nach Zusatz von jeweils ca. 10 ml kalter HANKS-Lösung mit einer Schere fein zerkleinert. Diese Gewebestücke einschließlich der ca. 10 ml HANKS-Lösung wurden in ein Pottergefäß (BRAUN-Melungen, 280 S) umgefüllt. Durch zweimaliges bzw. einmaliges Ab- und Aufbewegen des dazu passenden Teflon-Stempels wurden die Zellen weiter aufgeschlossen. Drehbewegungen des Teflon-Stempels im Pottergefäß und damit zu hohe Krafteinwirkung auf die Zellen (Über- bzw. Unterdruck) wurden vermieden. Die entstandene Zellsuspension wurde aus dem Pottergefäß in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und 90 s (Milz) bzw. 60 s (Thymus) bei 2900 U/min (650 x g) zentrifugiert (HEKA-Tischzentrifuge, BHG, Stufe 2). Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in 2,5 ml HANKS-Lösung resuspendiert und durch 2 Lagen von Strumpfnylon in ein in Eiswasser vorgekühltes Zentrifugenröhrchen filtriert. Das Filtrat-Röhrchen wurde bis zur weiteren Verwendung in einem mit Eiswasser gefüllten Becherglas aufbewahrt.

3.3.2. Zellzählung

Vom Filtrat wurden 0,1 ml entnommen und in einem Zentrifugenröhrchen mit HANKS-Lösung 1:20 (v/v) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde wiederum 0,1 ml entnommen und in einem EPPENDORF-Reaktionsgefäß (Nr. 3812) mit TÜRKS-Lösung (Kernfärbung) 1:10 (v/v) verdünnt. Nach 2 Minuten Wartezeit konnten die FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammern beschickt und die Zellen gezählt werden. Die Zellkonzentration im Filtrat wurde unter Berücksichtigung der gezählten Zellzahl, der Verdünnungsstufen und des Zählkammerfaktors errechnet. Durch unterschiedlich starke Verdünnung mit HANKS-Lösung wurde die gewünschte Zellkonzentration von 15×10^6 Zellen/ml hergestellt.

3.3.3. Inkubationen

Pro Analyse wurden in 2 Reaktionsgefäße (EPPENDORF 3812) je 1 ml der auf 15×10^6 Zellen/ml eingestellten Zellsuspension gegeben. Nach Zusatz von 100 μ l HANKS-Lösung je Reaktionsgefäß - mit oder ohne (Kontrollsuspension) gelösten Testagens - wurden beide Proben unter leichtem Schütteln 30 min im Wasserbad bei 37°C bzw. 45°C (Hyperthermie) inkubiert. Sofort nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionsgefäße in ein mit Eis gefülltes Becherglas verbracht und hier bis zur Röntgenbestrahlung bzw. bis zum Auftragen der Suspensionen auf den Saccharosegradienten aufbewahrt.

3.3.4. Röntgenbestrahlung von Milz- und Thymuszellen in vitro

Nach Inkubation wurden die je 1 ml Zellsuspension enthaltenden Reaktionsgefäße (EPPENDORF 3812) in Eis gelagert. Das Reaktionsgefäß mit der zu bestrahlenden Zellsuspension wurde kurz vor Bestrahlung auf eine mit Eis gefüllte Petrischale gelegt und - analog 3.2.1. - exponiert. Die Energiedosisleistung betrug auf der Ebene der Reaktionsgefäße 61,75 cGy/min. Die Bestrahlungsdauer hing von der zu verabreichenden Dosis ab. Nach Strahlenexposition wurden sowohl die Kontrolle als auch die bestrahlte Zellsuspension bis zum Auftragen auf den Saccharosegradienten in Eis aufbewahrt.

3.3.5. Gewinnung und Zentrifugation der Nucleoide

Die über Nacht bei 4°C aufbewahrten 6 Zellulosehülsen mit den Saccharosegradienten wurden vor Versuchsbeginn aus der Kühlzelle genommen. Die Gradienten wurden gewogen und zu 3 gleich schweren Paaren zusammengestellt. Ergab sich innerhalb eines Gradientenpaares ein Gewichtsunterschied von mehr als 0,1 g (Toleranzgrenze des Ungleichgewichts für die Ultrazentrifugation), so wurde dieser durch tropfenweisen Zusatz der Gradientenlösung mit dem niedrigsten Saccharosegehalt ausgeglichen bzw. unter den Wert von 0,1 g verkleinert. Anschließend erfolgte das Auftragen von 0,34 ml Lyse- lösung auf jeden der 6 Gradienten.

Um jeden mechanischen Störfaktor, der zur Bildung unklarer

Nucleoid-Banden hätte beitragen können, auszuschalten, wurde die LyseLösung so langsam aufgetragen, daß es zu keiner Wellenbildung an der Grenzfläche zum Saccharosegradienten kam. Dies erreichte man dadurch, daß die Kanüle fast senkrecht an die Innenwand der Zentrifugenhülse angesetzt wurde, um so fast nur die Schwerkraft als beschleunigende Kraft der LyseLösung wirksam werden zu lassen. Bis zum weiteren Gebrauch blieben die Gradienten zum Schutz gegen Luftverunreinigungen zugedeckt bei Raumtemperatur stehen. Beim Auftragen der zubereiteten Zellsuspensionen verfuhr man analog dem Auftragen der LyseLösung. Direkte UV-Licht-Einstrahlung war zu vermeiden. Nach Zusatz von 0,25 ml (in vitro-Versuche) bzw. 0,17 ml (in vivo-Versuche) der auf 15×10^6 Zellen/ml eingestellter Zellsuspension blieb zwischen oberem Flüssigkeitsmeniskus und Zentrifugenhülsenrand noch ein etwa 0,9 cm breiter Rand. Bevor die Zellen 30 min (in vitro-Versuche) bzw. 45 min (in vivo-Versuche) im Dunkeln bei Raumtemperatur lysiert wurden, wurden nochmals die Gewichte festgestellt und mögliche Gewichtsunterschiede innerhalb der vorher zusammengestellten Gradientenpaare korrigiert. Anschließend wurden die Proben in der BECKMAN Ultrazentrifuge L2 mit dem Rotor SW 41 60-120 min bei 20°C und 25 000 U/min zentrifugiert. Nach Zentrifugation konnten die im UV-Licht fluoreszierenden Nucleoidbanden gesehen werden. Ihre genaue Lage und Breite wurde mit einem Farbstift auf den Zentrifugenhülsen markiert und ausgemessen.

Als Sedimentationsstrecke wurde die Entfernung der Bandenmitte vom oberen Flüssigkeitsmeniskus der Zentrifugenhülsen definiert.

3.3.6. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellsuspensionen hatte ergänzenden Charakter und erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm anhand einer mit reiner DNA erstellten Eichkurve.

3.3.6.1. Aufstellung der DNA-Eichkurve

- a) Zunächst wurden 20 mg DNA in 10 ml HANKS-Lösung gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 6 Verdünnungsstufen mit folgenden DNA-Konzentrationen hergestellt:
- 1) 0,5 mg/ml
 - 2) 0,25 mg/ml
 - 3) 0,125 mg/ml
 - 4) 0,0625 mg/ml
 - 5) 0,03125 mg/ml
 - 6) 0,015625 mg/ml
- b) Aus jeder Verdünnungsstufe entnahm man für 3 Reaktionsgefäße (EPPENDORF 3812) je 0,5 ml DNA-Lösung, sodaß man insgesamt 18 Reaktionsgefäße mit 0,5 ml Inhalt erhielt.
- c) Die weitere Behandlung der DNA-Lösung erfolgte nach folgendem Schema:
- Fällung mit 1 ml Perchlorsäure (1,5 mol/l) pro Reaktionsgefäß

- 10 min einer Temperatur von -15°C aussetzen
- 5 min Zentrifugation (EPPENDORF-Zentrifuge 5413;
6500 x g)
- Überstand absaugen
- Zusatz von 1 ml Perchlorsäure (1 mol/l) pro Reaktions-
gefäß (1. Waschung)
- 5 min Zentrifugation (EPPENDORF-Zentrifuge 5413;
6500 x g)
- Überstand absaugen
- Erneuter Zusatz von 1 ml Perchlorsäure (1 mol/l)
(2. Waschung)
- 5 min Zentrifugation (EPPENDORF-Zentrifuge 5413;
6500 x g)
- Überstand absaugen
- Zusatz von 2 ml Perchlorsäure (1 mol/l) pro Reaktions-
gefäß
- 20 min Erhitzen auf 90°C im Wasserbad
- 20 min einer Temperatur von -15°C aussetzen
- 10 min Zentrifugation (EPPENDORF-Zentrifuge 5413;
6500 x g)
- Messung der Extinktion des Überstandes bei 260 nm
(Absorptionsmaximum für Nucleinsäuren) im Spektral-
photometer (PMQ II, ZEISS, Stuttgart) mit DNA-freier
Perchlorsäure (1 mol/l) als Referenzlösung (lineare Re-
gressionsgerade der Extinktion (y) in Abhängigkeit von
der DNA-Konzentration: $y=0,00296 + 2,2160 x$; $r=0,9999$).

3.3.6.2. Bestimmung der DNA-Konzentrationen der verschiedenen Zellsuspensionen

Für die Messung der DNA-Konzentrationen von Zellsuspensionen wurden jeweils 0,5 ml in ein Reaktionsgefäß (EPPENDORF 3812) abgefüllt und dem unter 3.3.6.1. c beschriebenen Untersuchungsgang unterzogen. Die entsprechende DNA-Konzentration x wurde mit Hilfe der Regressionsgleichung aus dem gemessenen Extinktionswert errechnet.

3.3.7. Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Innerhalb eines Versuches wurden die Mittelwerte der Kontroll- und Versuchsproben berechnet. Bei Wiederholungsanalysen wurden die so erhaltenen Werte der Einzelversuche gemittelt, in Prozent umgerechnet und in Säulendiagrammen dargestellt; die Längsstriche entsprechen der Streuung der Einzelwerte einer Gruppe um das Gruppenmittel (Standardabweichung), die nach folgender Formel berechnet wurde:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

s_x = Standardabweichung

x_i = Werte der Einzelmessungen

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der Einzelmessungen

n = Anzahl der Versuche einer Versuchsreihe

Werte, die nur geringe Effekte erkennen ließen oder hohe Standardabweichungen zeigten, wurden einer Signifikanzanalyse unterzogen. Die Mittelwerte wurden anhand des t-Testes nach STUDENT mit $p \leq 0,05$ verglichen (55).

4. ERGEBNISSE

4.1. In vitro-Versuche

Es wurden 11 Versuche mit Milz- und 11 Versuche mit Thymuszellpräparationen durchgeführt. Bei jedem Versuch wurde die Zellpräparation mit ein oder zwei Testagentien behandelt. Der Versuchszweck bestand darin festzustellen, ob einige chemische Agentien in Kombination mit Röntgenbestrahlung den Bestrahlungseffekt an Milz- und Thymuszellen bei der Nucleoidsedimentation deutlicher sichtbar werden ließen als Röntgenbestrahlung allein. Dabei wurde an einen möglichen Einsatz dieser chemischen Agentien bei den später folgenden in vivo-Versuchen gedacht.

Einen Überblick über die Ergebnisse der in vitro-Versuche gibt Tab.2.

4.1.1. Hyperthermie

Im Vergleich zu den Kontrollproben reagierten beide Zellarten mit einer Sedimentationsbeschleunigung ihrer Nucleoide, wobei die Thymuszellen empfindlicher reagierten. Zusätzlich zu den üblicherweise sichtbaren Hauptbanden (vgl. auch Abb.1). waren direkt unterhalb der Lyselösung nicht eindeutig abgrenzbare Nucleoidbanden besonders geringer Sedimentierbarkeit von etwa 3 mm Breite zu erkennen.

Tab.2: Sedimentation von Milz- und Thymusnucleoiden nach Behandlung der Zellen mit Test-agentien in vitro. Absolute Sedimentationsstrecken (in cm) von Kontroll- bzw. Versuchsproben mit Standardabweichung von 2 (Nr.8 und Nr. 9) oder 3 Parallelsedimentationen (übrige Ziffern). Abkürzungen: ∇ : Röntgenbestrahlung, EB: Ethidiumbromid, NOVO: Novobiocin

M i l z		T h y m u s				
Nr. des VS	Kontroll- proben	Versuchs- proben	Testagentien	Zentri- fugat.- dauer	Kontroll- proben	Versuchs- proben
1	2,79 $\pm$ 0,09	3,06 $\pm$ 0,15	Hyperthermie 45°C	90 min	2,75 $\pm$ 0,05	3,34 $\pm$ 0,13
2	3,12 $\pm$ 0,03	2,07 $\pm$ 0,03	∇ (114 cGy)	90 min	2,63 $\pm$ 0,06	1,87 $\pm$ 0,03
3	2,38 $\pm$ 0,24	1,95 $\pm$ 0,09	∇ (61,75 cGy)	90 min	2,52 $\pm$ 0,12	1,87 $\pm$ 0,03
4	2,73 $\pm$ 0,08	2,15 $\pm$ 0,05	EB (3 μ g/ml)	90 min	2,87 $\pm$ 0,08	2,03 $\pm$ 0,16
5	1,72 $\pm$ 0,06	1,6 $\pm$ 0,05	EB (3 μ g/ml) + ∇ (61,75 cGy)	90 min	1,75 $\pm$	1,67 $\pm$ 0,03
6	1,75 $\pm$ 0,05	1,48 $\pm$ 0,03	3-Aminobenzamid (10 ⁻² mol/l) + ∇ (61,75 cGy)	60 min	1,87 $\pm$ 0,12	1,5 $\pm$ 0,05
7	1,7 $\pm$ 0,05	1,55 $\pm$ 0,05	Gemisch araC (4x10 ⁻⁴ mol/l)/ddT (5x10 ⁻⁴ mol/l)+ ∇ (61,75 cGy)	60 min	1,62 $\pm$ 0,12	1,5 $\pm$ 0,1
8	2,07 $\pm$ 0,3	a) 2,42 $\pm$ 0,11 b) 3,45 $\pm$ 0,07	a) NOVO (700 μ g/ml) b) NOVO (800 μ g/ml)	60 min	2,2 $\pm$ 0	a) 2,7 $\pm$ 0 b) 2,9 $\pm$ 0
9	2,05 $\pm$ 0,07	a) 3,47 $\pm$ 0,03 b) 3,4 $\pm$ 0	a) NOVO (800 μ g/ml) b) NOVO (900 μ g/ml)	60 min	2,07 $\pm$ 0,03	a) 3,25 $\pm$ 0,14 b) 3,42 $\pm$ 0,03
10	3,65 $\pm$ 0,31	3,57 $\pm$ 0,37	NOVO (900 μ g/ml) + ∇ (61,75 cGy)	60 min	2,78 $\pm$ 0,08	2,37 $\pm$ 0,17
11	1,85 $\pm$ 0,05	1,73 $\pm$ 0,03	NOVO (800 μ g/ml) + ∇	60 min	2,65 $\pm$ 0,1	2,22 $\pm$ 0,15

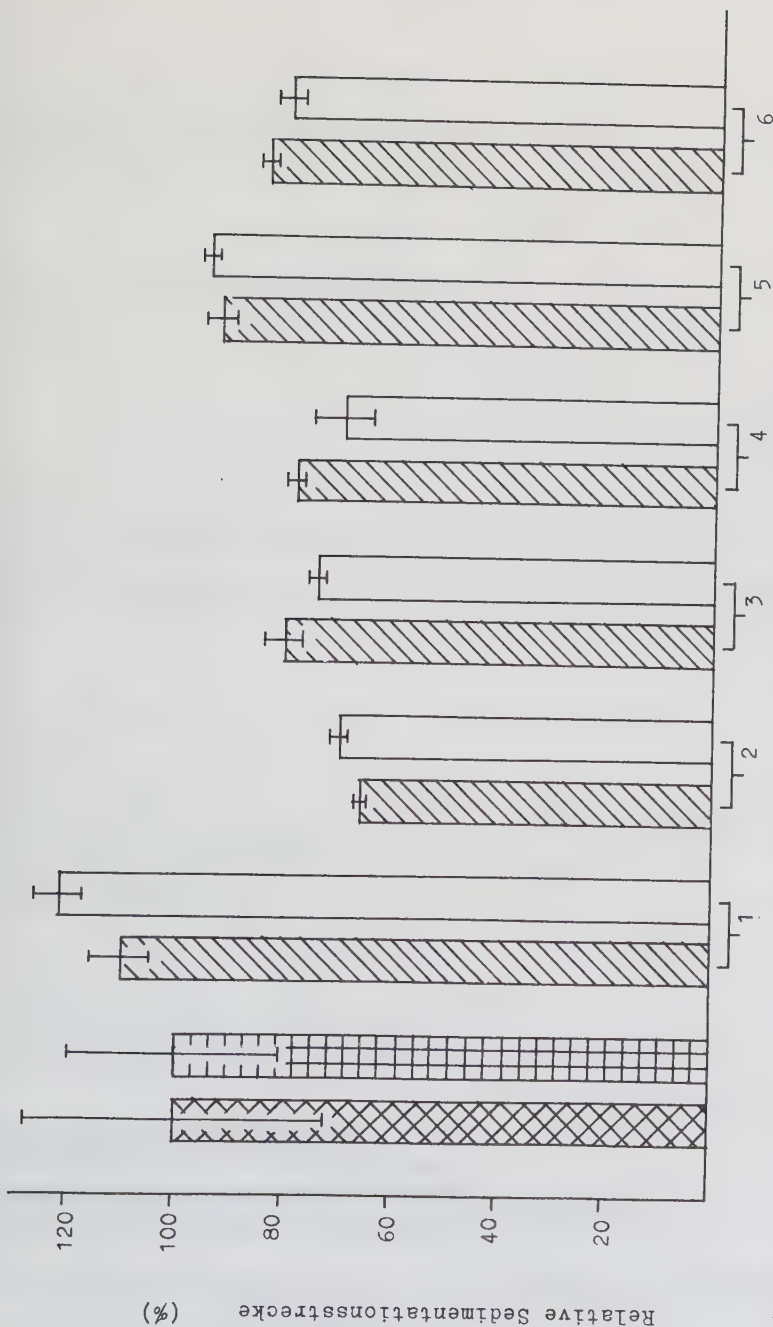
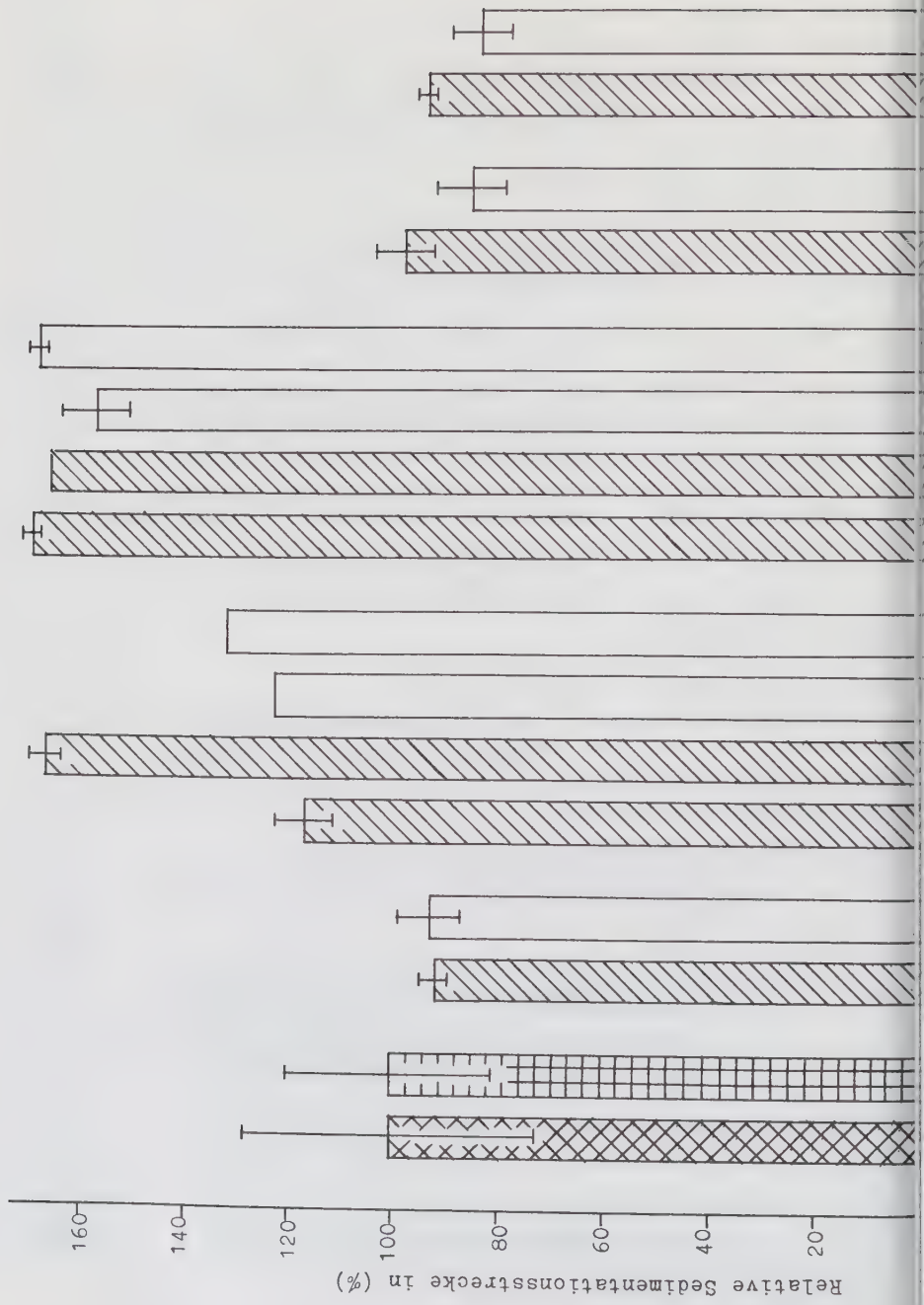


Abb.2: Sedimentation von Milz- und Thymusnucleoiden nach Behandlung der Zellen mit Test-Agentien in vitro. Ordinate: Sedimentationsstrecke in Prozent der Sedimentationsstrecke nicht-behandelter Kontrollproben mit Standardabweichung von 2 (Nr8) und (Nr.9) oder 3 Parallelsedimentationen (übrige Ziffern). Symbole: schräg bzw. quergestrichelt: nur mit agensfreier HANKS' Lösung behandelte Milz- bzw. Thymuskontrollen; schräg schraffiert: Milznucleoide; weiß: Thymusnucleoide. Angaben im übrigen wie in Tab.1. Gleiche Numerierung der Versuche wie in Tab.1. Fortsetzung Abb.2 siehe Seite 62.



4.1.2. Röntgenstrahlen

Auf eine Vorinkubation (37°C , Wasserbad) von 30 Minuten und anschließende Röntgenbestrahlung mit Dosen von 114 cGy (Versuchsnummer 2) bzw. 61,75 cGy (Versuchsnummer 3) reagierte die Milzzellen mit einer deutlichen Verlangsamung der Nucleoidsedimentation um etwa 35% bzw. 20%, die Thymuszellen mit einer solchen um etwa 30% bzw. 25%. Bei beiden Zellarten müssen somit größere Veränderungen der Nucleoidstruktur eingetreten sein (Tab.2, Abb.2, Nr.2 und Nr.3).

4.1.3. Ethidiumbromid (EB)

Nach 30-minütiger Vorinkubation (37°C , Wasserbad) mit EB (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) war die Sedimentationsstrecke der Nucleoide gegenüber den Kontrollproben um etwa 20% (Milz) bzw. 30% (Thymus) verkürzt. Die Thymuszellen waren etwas empfindlicher (Tab.2, Abb.2, Nr.4).

4.1.4. Ethidiumbromid und Röntgenstrahlen

Die kombinierte Anwendung dieser beiden Test-Agentien hatte gegenüber der Anwendung der Einzelagentien eine Verschlechterung des Ergebnisses zur Folge, d.h., der Unterschied zwischen den Sedimentationsstrecken von Kontroll- und Versuchsproben war bei beiden Zellarten auf etwa 5% geschrumpft (Tab.2, Abb.2, Nr.5).

4.1.5. 3-Aminobenzamid und Röntgenstrahlen

Eine Vorinkubation (37°C , Wasserbad) mit 3-Aminobenzamid und anschließende Bestrahlung mit einer Dosis von 61,75 cGy

verkürzte die Sedimentationsstrecke der Milz- und Thymus-nucleoide um 15% bzw. 20% (Tab.2, Abb.2, Nr.6).

4.1.6. 1- β -D-Arabinofuranosylcytosin(araC)-,3',5'-Dideoxy-thyminidin (ddT)-Gemisch und Röntgenstrahlen

Die auf die vorgeschriebene Zellzahl eingestellten Zellsuspensionen wurden vor Bestrahlung mit einer Dosis von 61,75 cGy einer 30-minütigen Inkubation (37°C, Wasserbad) mit einem Gemisch aus araC (4×10^{-4} mol/l) und ddT (5×10^{-4} mol/l) unterzogen. Der Unterschied der Sedimentationsstrecken zwischen Kontroll- und Versuchsproben war für beide Zellarten nahezu gleich groß und lag bei etwa 10% (Tab.2, Abb.2, Nr.7).

4.1.7. Novobiocin

In den Versuchen Nr. 8 und Nr. 9 wurde der Einfluß von Novobiocin auf die lymphatischen Zellen konzentrationsabhängig untersucht. Dabei ergab sich bei beiden Zellarten und allen verwendeten Novobiocinkonzentrationen eine Beschleunigung der Nucleoidsedimentation. Während eine Novobiocinkonzentration von 700 $\mu\text{g/ml}$ zwischen Kontroll- und Versuchsproben nur einen Unterschied von etwa 15% bei Milz-nucleoiden und von etwa 20% bei Thymusnucleoiden bewirkte, lag die Differenz bei beiden Nucleoidarten ab 800 $\mu\text{g/ml}$ nicht unter 30%. Novobiocinkonzentrationen von 800 $\mu\text{g/ml}$ und 900 $\mu\text{g/ml}$ wirkten sich dabei annähernd gleich aus (Tab.2, Abb.2, Nr.8 und Nr.9).

4.1.8. Novobiocin und Röntgenstrahlen

Die Bestrahlung mit einer Dosis von 61,75 cGy wirkte sich nach einer Vorinkubation mit zwei verschiedenen Novobiocinkonzentrationen (900 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 800 $\mu\text{g/ml}$) annähernd gleich aus. Während die Milznucleoide bei beiden Versuchen nur andeutungsweise eine Sedimentationsverlangsamung erkennen ließen, war diese bei den Thymusnucleoiden ausgeprägter und lag bei etwa 15% (Tab.2, Abb.2, Nr.10 und Nr. 11).

4.2. In vivo-Versuche

4.2.1. Versuche zur Zeitabhängigkeit

Es wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt.

Bei der ersten Versuchsreihe wurden die Tiere röntgenbestrahlt und die Organe Milz und Thymus zeitabhängig untersucht. Es wurde die Bestrahlungsdosis von 760 cGy gewählt, weil nach Applikation dieser Dosis und bei sofortiger Organentnahme erfahrungsgemäß mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Sedimentationsstrecken der bestrahlten und der unbestrahlten Nucleoide zu rechnen war. Durch die Organentnahme zu verschiedenen Zeitpunkten nach Exposition sollte der Zeitpunkt festgestellt werden, bei welchem das Sedimentationsverhalten der Nucleoide bestrahlter Tiere am stärksten von jenem der unbestrahlten Kontrollen abwich. Das Sedimentationsverhalten der bestrahlten Milz- und Thymusnucleoide zeigte innerhalb des gewählten Zeitabschnittes einen biphasischen Verlauf: Bei beiden Zellarten kam es zu einer deutlichen Verkürzung der Sedimentationsstrecke um

etwa 30% gegenüber den Kontrollen, sobald die Organe unmittelbar nach Strahlenexposition exstirpiert worden waren. Diese anfangs starke Verlangsamung der Nucleoidsedimentation wurde allmählich schwächer und ging schließlich in eine Beschleunigung der Nucleoide von bestrahlten Tieren über, so daß 6 h nach Strahlenexposition die Milznucleoide eine um etwa 10%, die Thymusnucleoide eine um etwa 35% schnellere Nucleoidsedimentation zeigten. Bei den Thymuszellen setzte die Phase beschleunigter Nucleoidsedimentation etwas schneller ein als bei Milzzellen (Tab.3, Abb.3).

Nach diesen orientierenden Versuchen zur Zeitabhängigkeit festgestellter Veränderungen lag es nahe, in weiteren Versuchsreihen die Dosisabhängigkeit der Veränderung der Nucleoidsedimentation vor allem unmittelbar sowie 6 h nach Exposition zu untersuchen. Da die o.g. Veränderungen an Milz und Thymus gleichermaßen nachweisbar waren, beschränkten sich die folgenden Analysen auf den Thymus. Die Ergebnisse sind in den Abschnitten 4.2.2. - 4.2.4. dargestellt. Schließlich sollte die Frage beantwortet werden, ob sich kleinere Strahlendosen ($\ll$ DL 50/30) mit Hilfe der Nucleoidsedimentation auch zu einem späteren Zeitpunkt (hier: 24 h) nachweisen lassen.

4.2.2. Versuche zur Dosisabhängigkeit

4.2.2.1. Aufarbeitung unmittelbar nach Exposition

Die Sedimentationsstrecke der Thymusnucleoide wurde nur nach Dosen von 760 cGy und 1570 cGy statistisch signifikant um etwa 20% vermindert. Die aus Tab. 4 ersichtlichen

Tab.3: Sedimentation von Milz- und Thymusnucleoiden von Ratten nach Röntgenbestrahlung in vivo mit 760 cGy zeitabhängig (Wartezeit). Absolute Sedimentationsstrecken (in cm) von Kontroll- und Versuchsproben mit Standardabweichung von 3 Parallelsedimentationen. Anmerkung: Probenvolumen: 0,25 ml; Lysezeit: 30 min. Zu Ziff.5: Die Milzzellkonzentration betrug $14,25 \times 10^6/\text{ml}$.

<u>M i l z</u>			<u>Milz + Thymus</u>		<u>T h y m u s</u>	
Nr. des VS	Kontrollproben	Versuchsproben	Wartezeit	Zentrifugationsdauer	Kontrollproben	Versuchsproben
1	$2,17 \pm 0,16$	$1,92 \pm 0,11$	0 h p.i.	90 min	$2,4 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,05$
2	$2,85 \pm 0,09$	$2,17 \pm 0,08$	0,75h p.i.	120 min	$2,57 \pm 0,15$	$2,45 \pm 0,05$
3	$2,98 \pm 0,18$	$2,38 \pm 0,15$	1,5 h p.i.	120 min	$2,53 \pm 0,06$	$2,47 \pm 0,13$
4	$3,17 \pm 0,16$	$2,73 \pm 0,06$	3 h p.i.	120 min	$2,58 \pm 0,10$	$2,87 \pm 0,19$
5	$2,78 \pm 0,10$	$3,02 \pm 0,03$	6 h p.i.	120 min	$2,73 \pm 0,10$	$3,72 \pm 0,21$

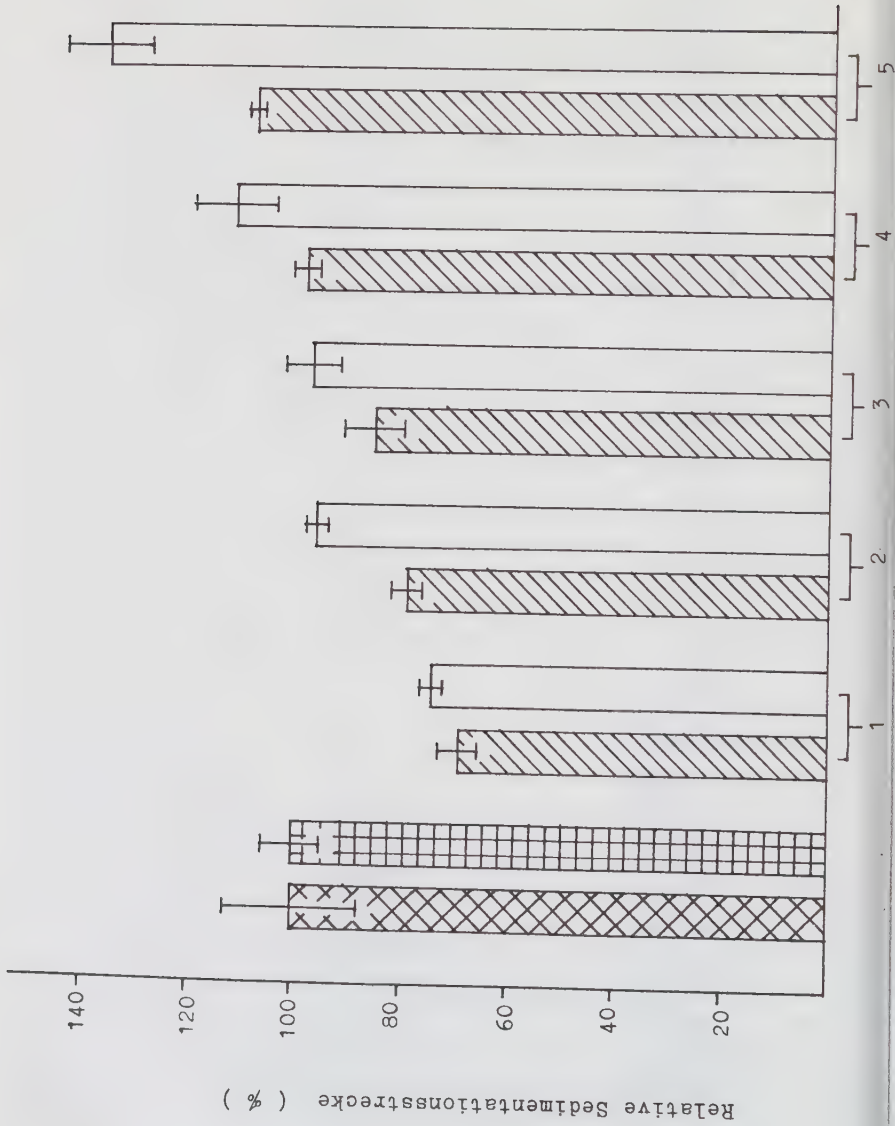


Abb. 3: Sedimentation von Milz- und Thymusnucleoiden von Ratten nach Röntgenbestrahlung in vivo mit 760 cGy zeitabhängig. Sedimentationsstrecke in Prozent der Sedimentationsstrecke von Nucleoiden nicht-bestrahlter Kontrollproben mit Standardabweichung von 3 Parallelsedimentationen. Symbole: schräg bzw. quergenezt: Milz- bzw. Thymuskontrollen; schräg schraffiert: Milz-nucleoide; weiß: Thymusnucleoide. Gleiche Numerierung der Versuche wie in Tab. 3; Angaben im übrigen wie in Tab. 3.

Modifikationen des Versuchsablaufes hatten keinen signifikanten Einfluß auf das Sedimentationsverhalten der Thymusnucleoide; alle Versuche wurden daher unter den jeweiligen Bestrahlungsdosen zusammengefaßt (Tab.4, Abb.4).

4.2.2.2. Aufarbeitung 6 Stunden nach Exposition

Nach Dosen von 190 bzw. 380 cGy deutete sich eine gegenüber den Kontrollnucleoiden schnellere, statistisch nicht signifikante, Sedimentation der Versuchsproben an. Erst nach einer Strahlenexposition der Versuchstiere mit 760 bzw. 1520 cGy ergaben sich statistisch signifikante Ergebnisse, wobei die Versuchsnucleoide der Größe der Dosis entsprechend etwa 25% bzw. 45% weiter sedimentierten als die Kontrollen (Tab.5, Abb.5). Bemerkenswert war, daß es im Gegensatz zu der Versuchsreihe mit sofortiger Organentnahme nie zu einer Verlangsamung der Versuchsnucleoide kam, und daß zusätzlich folgendes Phänomen auftrat: Nach Strahlenexposition der Tiere mit einer Dosis von 190 cGy oder darüber kam es in den mit bestrahlten Zellen versehenen Proben während ihrer Sedimentation dicht unterhalb des unteren Flüssigkeitsmeniskus zur Bildung einer schmalen Extrabande. Diese, mit gelbweißem Farbton fluoreszierende Zone war nur in den Gradienten sichtbar, die EB enthielten (Tab.6, Abb.6). Bemerkenswert ist, daß sowohl der Abstand vom oberen Flüssigkeitsmeniskus als auch die Breite der Extrabanden dosisabhängig zunehmen (Tab.6).

Tab.4: Sedimentation von Thymusnucleoiden von Ratten nach Röntgenbestrahlung in vivo dosisabhängig; Organentnahme: unmittelbar nach Strahlenexposition. Absolute Sedimentationsstrecken (in cm) der Nucleoide von Kontroll- und Versuchsproben. Abkürzungen: $\bar{x}_{Kp} \pm s$ bzw. $\bar{x}_{Vp} \pm s$: Sedimentationsstrecken (in cm) der Kontroll- bzw. Versuchsproben mit Standardabweichung.

Anmerkungen: Ad 1a: Der Thymus lag nach Entnahme aus der Ratte 1 Tag im Kühlschrank (4°C), bevor er aufgearbeitet wurde. Ad 1b: Die Zellsuspension für die Versuchsprobe wurde nach Einstellung auf die übliche Zellzahl mit EB-Lösung (Endkonzentration 5 µg/ml) 30 min im Wasserbad (37°C) inkubiert. Ad 1g: Die EB-Konzentration des Saccharose-Gradienten wurde auf 2 µg/ml herabgesetzt. Ad 1f: Das Thymuszellenfiltrat wurde 1 Stunde im Wasserbad (37°C) inkubiert; danach wurde ohne Eis weitergearbeitet. Ad 3a: vgl. Ad 1a

Nr. des VS	Kontrollproben	$\bar{x}_{Kp} \pm s$	Versuchsproben	$\bar{x}_{Vp} \pm s$	Bestrahlungsdosis	Probenvolumen	Lysezeit	Zentrifugationsdauer
1a	3,3		3,1		190 cGy	0,25 ml	30 min	120 min
1b	2,5		2,48		190 cGy	0,25 ml	30 min	120 min
1c	2,98		2,8	2,5	190 cGy	0,25 ml	60 min	120 min
1d	2,45		2,32	±	190 cGy	0,14 ml	30 min	120 min
1e	2,55		2,38	0,41	190 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
1f	2,07		1,92		190 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
2a	3,02		2,43		380 cGy	0,25 ml	30 min	120 min
2b	2,3	2,59	2,28	2,33 ±	380 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
2c	2,6	±	2,35	0,09	380 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
2d	2,68		2,23		380 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
3a	2,4		1,9	2,07 ±	760 cGy	0,25 ml	30 min	90 min
3b	2,72	0,32	2,3	±	760 cGy	0,25 ml	30 min	90 min
3c	2,8		2,02	0,21	760 cGy	0,17 ml	45 min	90 min
4a	2,53		2,08		1520 cGy	0,25 ml	30 min	90 min
4b	2,05		1,9	2,03 ±	1520 cGy	0,17 ml	45 min	90 min
4c	2,53		2,1		1520 cGy	0,17 ml	45 min	90 min
4d	2,5		2,03	0,09	1520 cGy	0,17 ml	45 min	90 min

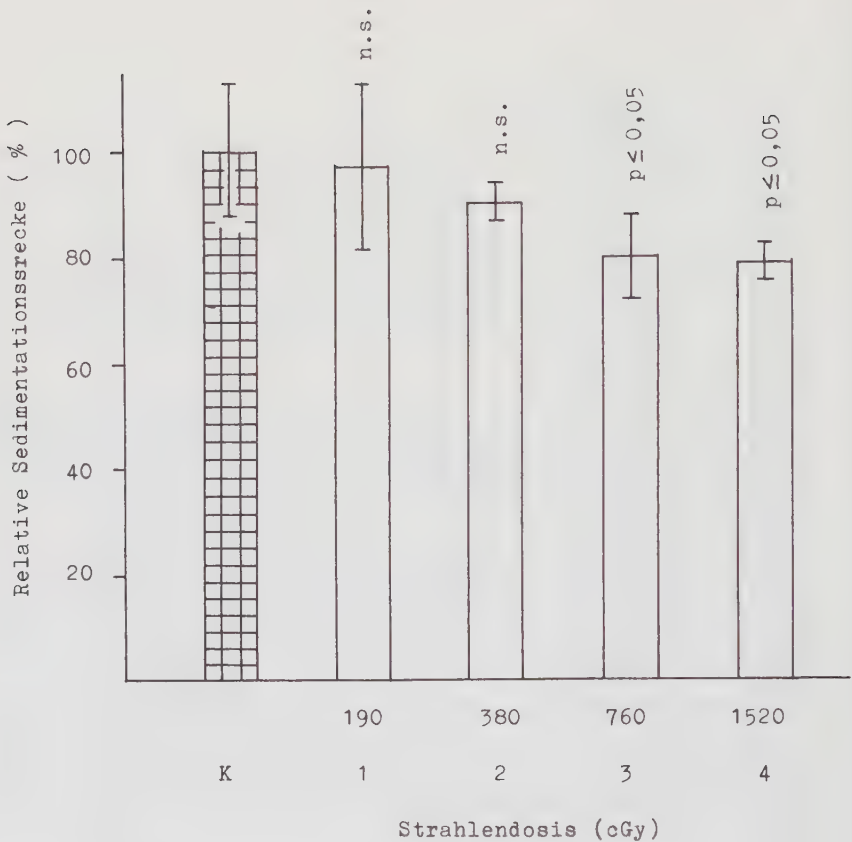


Abb.4: Sedimentation von Thymusnucleoiden von Ratten nach Röntgenbestrahlung in vivo dosisabhängig; sofortige Organentnahme. Ordinate: Sedimentationsstrecke in Prozent der Sedimentationsstrecke nicht-bestrahlter Kontrollproben mit Standardabweichung (n=6 (Nr.1), n=4 (Nr.2), n=3 (Nr.3) und n=4 (Nr.4)). K: Nicht-bestrahlte Kontrollproben. Angaben im übrigen wie bei Tab. 4. Gleiche Numerierung der Versuche wie in Tab. 4. n.s.: nicht signifikant.

Tab. 5: Sedimentation von Thymusnucleoiden von Ratten nach Röntgenbestrahlung in vivo dosisabhängig; Organentnahme: 6 h nach Strahlenexposition. Absolute Sedimentationsstrecke (in cm) von Kontroll- und Versuchsproben. Abkürzungen: $\bar{x}_{Kp} \pm s$ bzw. $\bar{x}_{Vp} \pm s$: Sedimentationsstrecke (in cm) der Kontroll- bzw. Versuchsproben mit Standardabweichung. Anmerkungen: Ad 1a: Der Thymus lag nach Entnahme 1 Tag im Kühlschrank (4°C), bevor er aufgearbeitet wurde; Ad 3a: vgl. Ad 1a; Ad 3b: Die Suspension aus bestrahlten Zellen enthielt nur $13,635 \times 10^3$ Zellen ohne Kernpyknose und wurde daher unverdünnt aufgetragen; Ad 4a: vgl. Ad 3b; Ad 4c: Anstatt EB befand sich Bisbenzimid (1 µg/ml) im Saccharosegradienten.

Nr. des VS	Kontrollproben	$\bar{x}_{Kp} \pm s$	Versuchsproben	$\bar{x}_{Vp} \pm s$	Bestrahlungsdosis	Probenvolumen	Lysezeit	Zentrifugationsdauer
1a	3,22		3,15	2,84 ₊	190 cGy	0,25 ml	30 min	120 min
1b	2,52		2,53	0,44	190 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
2a	2,33		2,87	2,81	380 cGy	0,25 ml	30 min	120 min
2b	2,57		2,78	±	380 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
2c	2,4		2,77	0,05	380 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
3a	2,73	2,64	3,72	3,33	760 cGy	0,25 ml	30 min	120 min
3b	2,32	±	3,08	±	760 cGy	0,25 ml	30 min	120 min
3c	2,42		2,77	0,48	760 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
3d	2,6		3,73		760 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
4a	2,93	0,28	3,77	3,89	1520 cGy	0,25 ml	30 min	120 min
4b	2,72		3,65	±	1520 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
4c	2,93		4,27	0,33	1520 cGy	0,17 ml	45 min	90 min

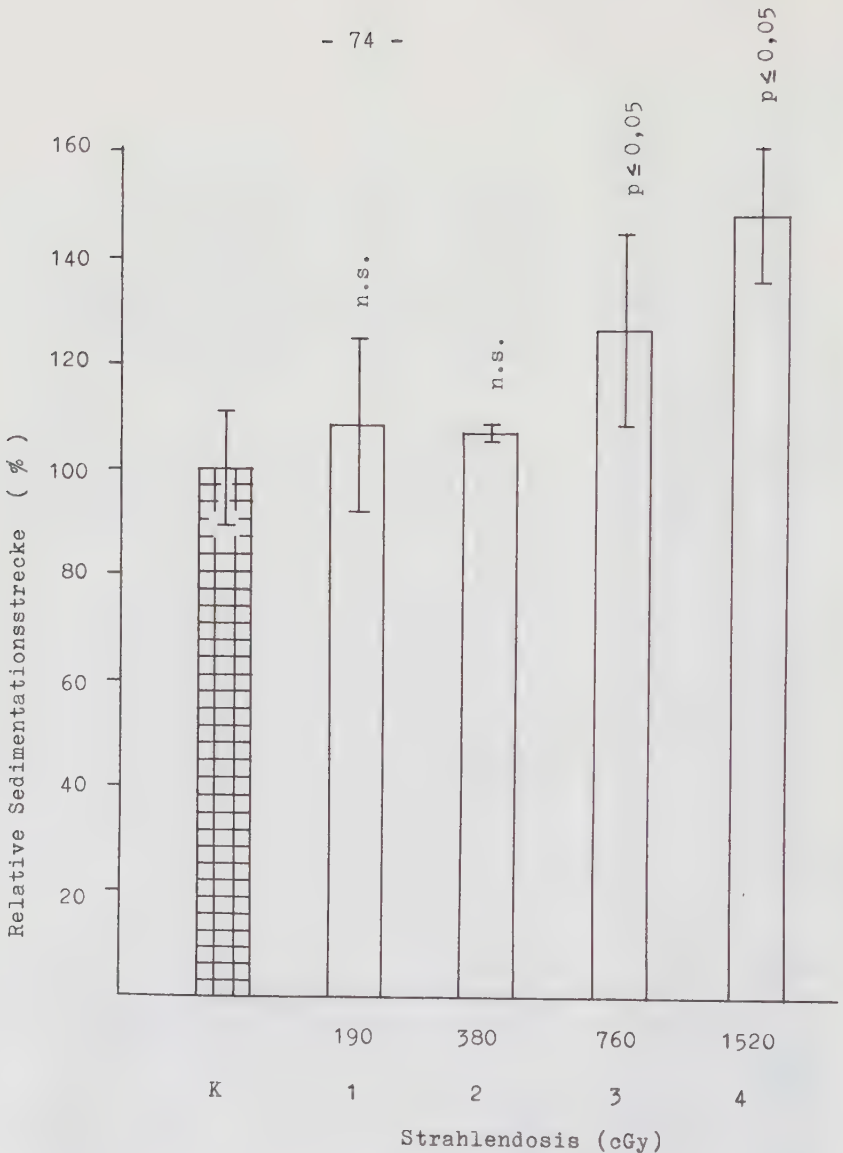


Abb.5: Sedimentation von Thymusnucleoiden von Ratten nach Röntgenbestrahlung in vivo dosisabhängig; Organentnahme: 6 h nach Strahlenexposition. Ordinate: Sedimentationsstrecke in Prozent der Sedimentationsstrecke nicht-bestrahlter Kontrollproben mit Standardabweichung. (n=2 (Nr.1), n=3 (Nr.2), n=4 (Nr.3), n=3 (Nr.4). K: Nichtbestrahlte Kontrollproben. Angaben im übrigen wie in Tab. 5. Gleiche Numerierung der Versuche wie in Tab. 5. n.s.: nicht signifikant. Die Signifikanzangabe bezieht sich nur auf die Sedimentationsstrecke jener Nucleoide, welche die Hauptbanden bildeten.

Tab.6: Lokalisation und Ausmaß der nach Röntgendosen von 380 cGy, 760 cGy und 1520 cGy im ethidiumbromidhaltigen Saccharosegradienten auftretenden Extrabanden der Thymus-nucleoide. Organentnahme: 6 h nach Strahlenexposition. a)

Strahlen-dosis	Abstand (in cm) vom oberen Flüssigkeitsmeniskus mit Standardabweichung	Bandenbreite (in cm) mit Standardabw.	n
380 cGy	$0,27 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0$	9
760 cGy	$0,4 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,03$	12
1520 cGy	$0,5 \pm 0,11$	$0,36 \pm 0,05$	6

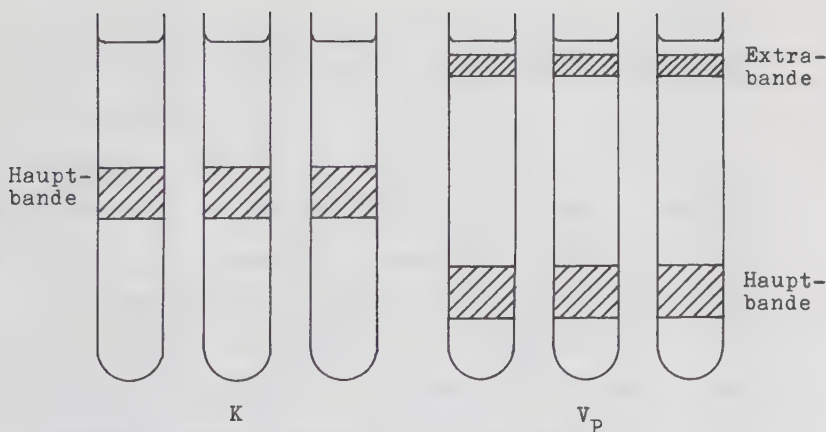


Abb.6: Sedimentation von Thymusnucleoiden nach Röntgenbestrahlung von Ratten in vivo mit 760 cGy; Organentnahme: 6 h nach Strahlenexposition. Schemazeichnung. Abkürzungen: K: Kontrollen, V_P: Versuchsproben

a) Nach einer Röntgendosis von 190 cGy traten ebenfalls Extrabanden auf, deren Lokalisation und Ausmaß aber nicht festgehalten wurden.

4.2.2.3. Aufarbeitung 24 Stunden nach Exposition

Strahlendosen von 95 cGy, 47,5 cGy und 23,75 cGy konnten auch dann nicht signifikant nachgewiesen werden, wenn die Thymi erst 24 h nach Strahlenexposition entnommen worden waren (Tab.7).

Nach höheren Dosen verminderte sich die Zellzahl von Thymus (und Milz) so sehr, daß die für die Nucleoidsedimentation erforderliche Zellkonzentration nicht mehr gewährleistet war.

4.2.3. Versuche zum Mechanismus der Beschleunigung der Nucleoidsedimentation nach Ganzkörperstrahlung

Da nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf die DNA vor allem Strangbrüche entstehen, ist die Verminderung der Nucleoidsedimentation nach Exposition nicht überraschend. Scheinbar paradox ist dagegen die Umkehr dieses Effektes trotz zeitabhängig fortschreitender Organschädigung ("6 Stunden-Effekt"). Weitere Versuche richteten sich daher auf die möglichen Mechanismen dieses zunächst nicht erwarteten und bisher auch nicht beschriebenen Vorganges. Um zu klären, ob die Verlängerung der Sedimentationsstrecke der bestrahlten Nucleoide gegenüber der der Kontrollen durch einen eventuell unterschiedlichen DNA-Gehalt der Proben bedingt war, wurde die DNA-Konzentration der auf die geforderte Zellzahl eingestellten Zellsuspension bestimmt (Abb.7). Diese Zellsuspensionen stammten aus Thymi, die

Tab.7: Sedimentation von Thymusnucleoiden von Ratten nach Röntgenbestrahlung in vivo dosisabhängig; Organentnahme: 24 h nach Strahlenexposition. Absolute Sedimentationsstrecken (in cm) von Kontroll- bzw. Versuchsproben. Abkürzungen: $\bar{x}_{Kp} \pm s$ bzw. $\bar{x}_{Vp} \pm s$: Sedimentationsstrecken (in cm) der Kontroll- bzw. Versuchsproben mit Standardabweichungen. Anmerkungen: Ad 1d, 2c, 2d und 3a: Die Saccharosegradienten enthielten Bisbenzimid (1 mg/ml); Ad 2a: Die Konzentration des Saccharosegradienten betrug 8-30%.

Nr. des VS	Kontrollproben	$\bar{x}_{Kp} \pm s$	Versuchsproben	$\bar{x}_{Vp} \pm s$	Bestrahlungsdosis	Probenvolumen	Lysezeit	Zentrifugationsdauer
1a	3,05	3,05 $\pm$	2,75	2,61 $\pm$ 0,41	95 cGy	0,25 ml	30 min	120 min
1b	2,42		2,18		95 cGy	0,17 ml	45 min	75 min
1c	2,37		2,4		95 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
1d	3,4		3,12		95 cGy	0,17 ml	45 min	90 min
2a	2,75	0,67	2,65	3,18 $\pm$ 0,91	47,5 cGy	0,17 ml	50 min	90 min
2b	2,73		2,27		47,5 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
2c	4,37		3,48		47,5 cGy	0,17 ml	45 min	120 min
2d	3,98		4,3		47,5	0,17 ml	45 min	120 min
3a	2,73		2,67	2,7 $\pm$ 0,04	23,75 cGy	0,17 ml	45 min	60 min
3b	2,67		2,72		23,75 cGy	0,17 ml	45 min	90 min

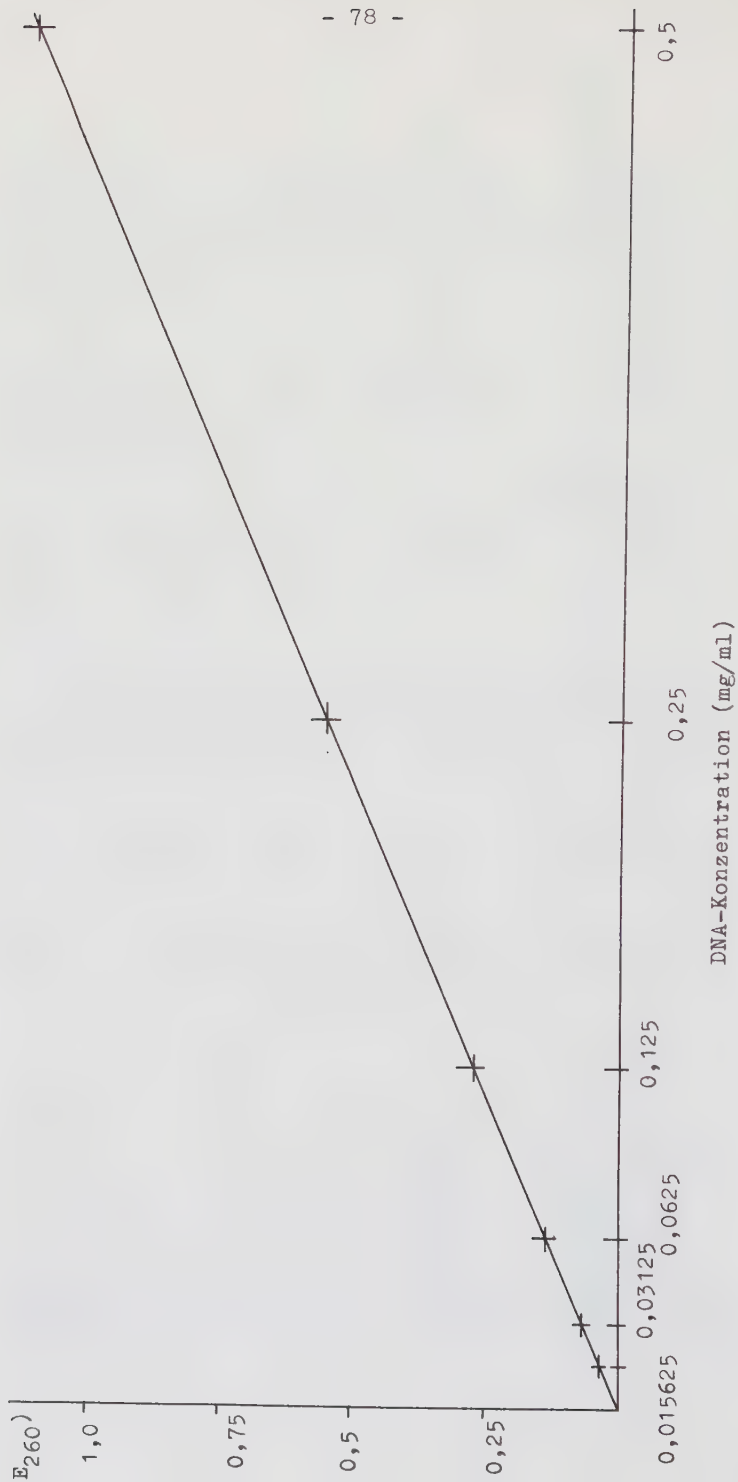


Abb. 7: DNA-Eichkurve - photometrische Messung: Extinktion E_{260} in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration; $n=3$ je Meßwert.

in vivo unterschiedlichen Strahlendosen ausgesetzt worden waren. Die Organe wurden immer 6 h nach Strahlenexposition entnommen.

Tab.8: DNA-Konzentrationen (in mg/ml) der auf 15×10^6 Zellen/ml eingestellten Kontroll- und Versuchsproben von Ratten; 6 h nach Strahlenexposition; n=1.

Nr. des VS	Bestrahlungs- dosis	Versuchs- proben A	Kontroll- proben B	$\frac{A}{B}$
1	190 cGy	0,168	0,135	1,24
2	380 cGy	0,328	0,192	1,71
3	760 cGy	0,621	0,177	3,51
4	1520 cGy	0,724	0,160	4,52

Aus Tab.8 ist zu entnehmen, daß die DNA-Konzentration der Versuchsproben dosisabhängig zunahm und nach einer Strahlendosis von 1520 cGy etwa 4,5fach über jener der Kontrollen lag. Somit lag es nahe, die unterschiedlichen DNA-Gehalte der Zellsuspensionen für die stark beschleunigte Sedimentation der Versuchs-nucleoide verantwortlich zu machen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden deshalb Zellsuspensionen unterschiedlicher Zellkonzentration aus unbestrahlten Thymi gewonnen und auf die Gradienten aufgetragen. So durchgeführte Nucleoidsedimentationen zeigten (Tab.9, Abb.8), daß eine Zellsuspension mit einer gegenüber den Kontrollen vierfach größeren DNA-Konzentration eine um etwa 10% längere Sedimentationsstrecke der Nucleoide bewirkte. Da dieser Wert deutlich unter dem Grad der Sedimentationsbeschleunigung

Tab.9: Sedimentation von Thymusnucleoiden aus Suspensionen unterschiedlicher Zellkonzentrationen. Absolute Sedimentationsstrecke (in cm) von Nucleoiden.
Abkürzungen: VS: Versuch; $\bar{x} \pm s$: Sedimentationsstrecke (in cm) der Kontroll- und Versuchsproben mit Standardabweichung.

Nr. des VS	Kontrollproben 10×10^6 Zellen/ml		Versuchsproben a 20×10^6 Zellen/ml		Versuchsproben b 40×10^6 Zellen/ml		Lysezeit
1	2,45	$\bar{x} \pm s$: 2,43 $\pm$ 0	2,5	$\bar{x} \pm s$: 2,47 $\pm$ 0,03	2,75	$\bar{x} \pm s$: 2,7 $\pm$ 0,07	45 min
2	2,45		2,45		2,65		90 min

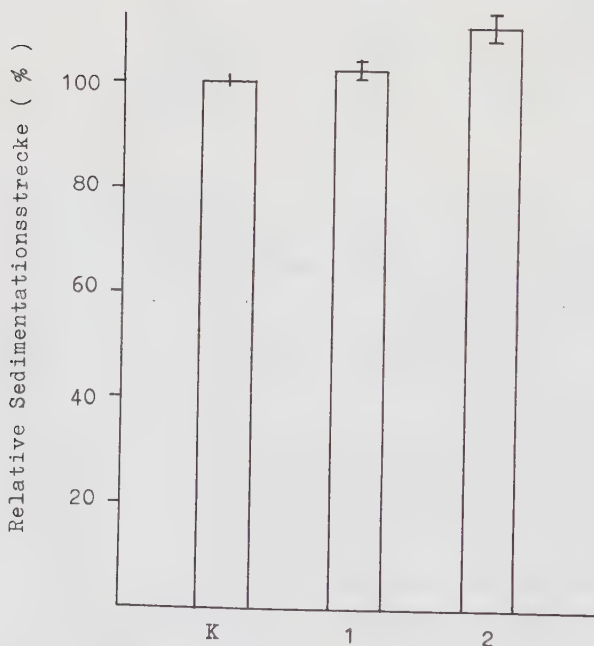


Abb.8: Sedimentation von Thymusnucleoiden aus Proben unterschiedlicher Zellkonzentrationen. Sedimentationsstrecke in Prozent der Sedimentationsstrecke von Nucleoiden der Kontrollproben mit Standardabweichung. Abkürzungen und Symbole: K: Kontrollproben (10×10^6 Zellen/ml); 1: Proben mit 20×10^6 Zellen/ml; 2: Proben mit 40×10^6 Zellen/ml; n=2.

6 h nach hochdosierter Ganzkörperbestrahlung liegt, reicht die Erhöhung der DNA-Konzentration nicht aus, um diesen Strahleneffekt zu erklären. Als weitere Erklärung war an die nach Röntgenbestrahlung mögliche Bildung von Verbindungen zwischen DNA und anhaftenden Kernproteinen der Nucleoide zu denken. Durch den Zusatz von Proteinase K zum Lysemedium wurde versucht, diese Verbindungen zu lösen. Ein Versuchsbeispiel zeigen Tab.10 und Abb. 9.

Wurden die mit 760 cGy bestrahlten Thymuszellen zusammen mit Proteinase K lysiert, so ließ die Nucleoidsedimentation in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration einen biphasischen Verlauf erkennen.

Tab.10: Sedimentation von Thymusnucleoiden von Ratten nach Röntgenbestrahlung in vivo mit 760 cGy. Organentnahme: 6 h nach Strahlenexposition. Absolute Sedimentationsstrecke (in cm) der Nucleoide von mit bzw. ohne Proteinase K - behandelten Proben. Abkürzungen: $\bar{x} \pm s$: Sedimentationsstrecke (in cm) der Proben mit Standardabweichung. Anmerkungen: Lysezeit: 1 h; zu Versuchen 2 und 3: 150 Minuten Zentrifugation.

Nr. des VS	Proben ohne Proteinase K in Lyselösung		Proben mit Proteinase K in Lyselösung		Proteinasekonzentration in Lyselösung
1 a	3,05	$\bar{x} \pm s$:	2,65	$\bar{x} \pm s$:	0,5 mg/ml
1 b	3,05		2,85	$2,67 \pm$	
1 c	3,15		2,5	0,17	
2 a	3,15	3,3	2,65	$\bar{x} \pm s$:	4 mg/ml
2 b	3,3	$\pm$	2,9	$2,78 \pm$	
2 c	3,25	0,31	2,8	0,12	
3 a	3,8		3,3	$\bar{x} \pm s$:	10 mg/ml
3 b	3,7		3,3	$3,27 \pm$	
3 c	3,75		3,2	0,06	

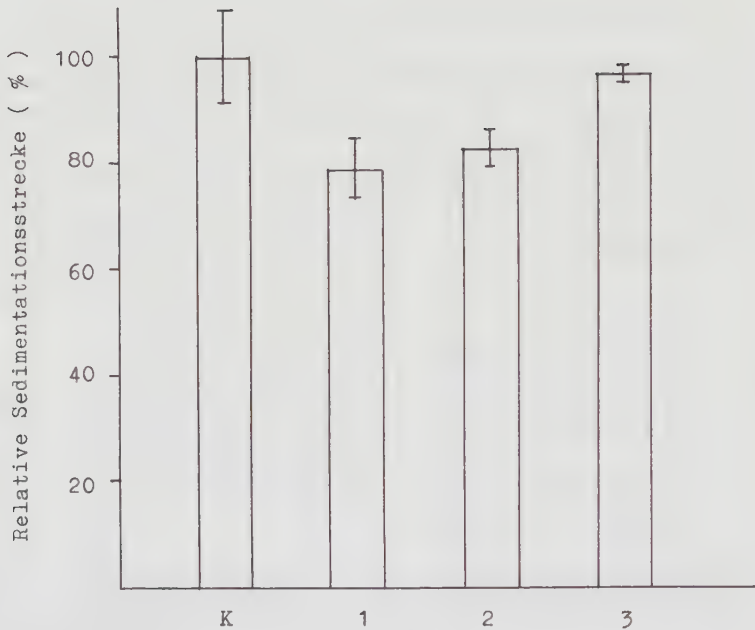


Abb.9: Sedimentation von Thymusnucleoiden von Ratten nach Röntgenbestrahlung in vivo mit 760 cGy; Organentnahme: 6 h nach Strahlenexposition. Ordinate: Sedimentationsstrecke von mit Proteinase K behandelten Proben in Prozent der Sedimentationsstrecke nicht behandelter Proben. Abkürzungen: K: Kontrollen (ohne Proteinase K); gleiche Numerierung wie in Tab.10. Angaben im übrigen wie in Tab.10.

Bei Proteinase K Konzentrationen von 0,5 mg/ml bzw. 4 mg/ml blieben die Nucleoide um etwa 20% gegenüber den Vergleichsproben zurück. Eine Erhöhung der Proteinase K-Konzentration im Lysemedium auf 10 mg/ml bewirkte dagegen eine nur mehr um 3% langsamere und damit nicht mehr signifikant von den Kontrollen verschiedene Nucleoidsedimentation.

4.2.4. Versuche zur Erklärung des "Extrabandenphänomens"

Die Bestimmung der DNA-Menge von 4 Extrabanden, die nach Nucleoidsedimentation aus Thymuszellen von Ratten nach Ganzkörperbestrahlung mit 760 cGy sichtbar gemacht worden waren, ergab einen Mittelwert von $0,0284 \text{ mg/ml} \pm 0,0054 \text{ mg/ml}$. Damit befanden sich in einer Extrabande etwa 4,5% der pro Gradient aufgetragenen DNA-Menge.

Wurde andererseits zu der auf die übliche Zellkonzentration von 15×10^6 Zellen eingestellten Zellsuspension reine DNA zugesetzt, erschien bei der Nucleoidsedimentation eine im UV-Licht ebenfalls fluoreszierende Extrabande (Abb.10), die nach Lage, Aussehen und Form mit jenen vergleichbar war, die einige Stunden nach hochdosierter Ganzkörperstrahlung unter sonst identischen Bedingungen nachgewiesen wurde (s. dazu Abschnitt 4.2.3. der Arbeit).

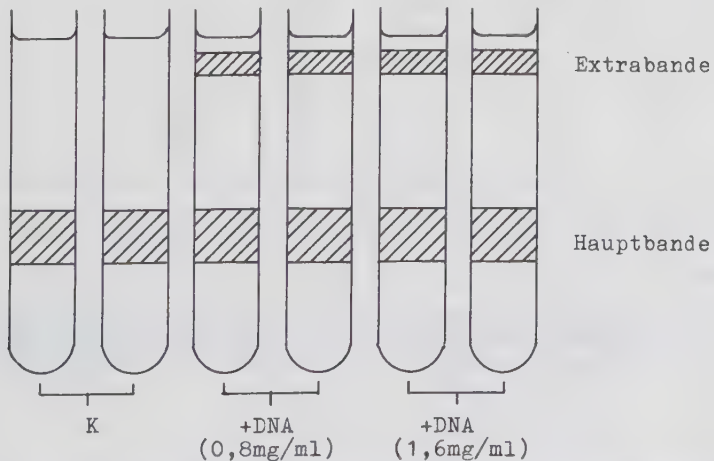


Abb.1 : Sedimentation von Thymusnucleoiden nach Zusatz reiner DNA. Schemazeichnung. Abkürzungen: K: Kontrollen

5. DISKUSSION

5.1. Zur Methode der Nucleoidsedimentation

Bei Erfassung von DNA-Strangbrüchen gehört die Nucleoidsedimentation zu den empfindlichsten physikalischen Nachweismethoden. Störfaktoren betreffen vor allem die Form und Konsistenz der Nucleoidbanden (Beispiele in Abb.11). Keine gut abgrenzbaren Banden, Nucleoidverklumpungen sowie Banden mit fadenförmigen Ausziehungen oder schräg liegende Banden machen eine exakte Messung der Sedimentationsstrecke unmöglich; die Versuchsergebnisse sind nicht verwertbar.

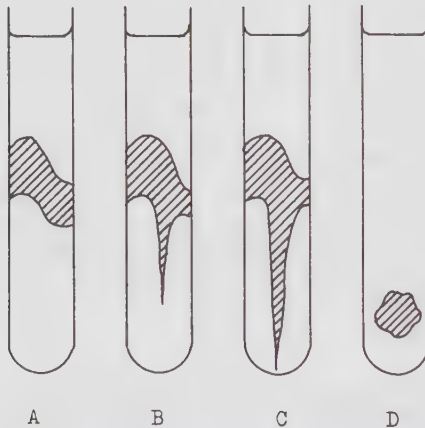


Abb.11: Nicht auswertbare Nucleoidsedimentationsergebnisse
A: Schräg liegende DNA, B+C: Ausziehungen der DNA
D: Verklumpte DNA

Fehler der genannten Art können weitgehend vermieden werden, wenn:

- 1) das Lysemedium auf die Gradienten gleich zu Beginn des Versuches in der unter 3.3.5. beschriebenen Art, d.h. nach Entnahme des Gradienten aus der Kühlzelle und vor Herstellung der Zellsuspension aufgetragen wird;
- 2) jede noch so kleine Erschütterung der gefüllten Zentrifugenröhrchen vermieden wird, z.B. vor dem Überschichten der Gradienten oder beim Einsetzen des beladenen Rotors in die Zentrifuge;
- 3) die hergestellte Zellsuspension mit der gleichen Vorsicht wie die Lyselösung in die Zentrifugenröhrchen gegeben wird;
- 4) bei sonst unveränderten Versuchsbedingungen die Lysezeit mindestens 30 min beträgt.

Abgesehen von den oben genannten Nachteilen bietet die Nucleoidsedimentation in der hier vorliegenden Modifikation zahlreiche Vorteile:

- 1) Die Nucleoidsedimentation ist einfach und schnell durchzuführen.
- 2) Während bei anderen Sedimentationstechniken die DNA im allgemeinen radioaktiv markiert und die Gradienten nach der Zentrifugation zerlegt werden, ist dies jetzt wegen der Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiumbromid oder Bisbenzimid nicht mehr nötig.

- 3) Mit der Nucleoidsedimentation können auch unstimulierte Lymphozyten oder sich nichtteilende Zellen untersucht werden, da deren DNA nicht mehr radioaktiv markiert werden muß.
- 4) Das Ergebnis der Nucleoidsedimentation ist anschaulich und eindeutig. Fehlversuche sind leicht zu erkennen (s.o.).
- 5) Die Nucleoidsedimentation ist als physikalische Nachweismethode in allen Fällen angezeigt, wo es um den experimentellen Nachweis von Veränderungen geht, die die Tertiärstruktur der DNA ("superhelix") betreffen. Dies ist bei vielen auf die DNA wirkenden physikalischen und/oder chemischen Noxen der Fall.
- 6) Die DNA ist innerhalb der Nucleoide gegenüber Scherkräften geschützt (14).
- 7) Die Methode ist auf die meisten Zellarten anwendbar (Erfahrungen liegen z.B. für Fibroblasten, Lymphoblasten, Erythroblasten, Karzinomzellen und menschliche Epithelzellen sowie für Zellen von Mäusen, Vögeln, Ratten, Amphibien und Insekten vor) (15).
- 8) Man kann nicht nur DNA-Einzelstrangbrüche nachweisen, sondern auch ihre Anzahl berechnen (59).

5.2. Zur Wirkungsweise der bei den in vitro-Versuchen eingesetzten Testagentien

5.2.1. Hyperthermie:

Nach Hyperthermie (Beispiel: Inkubation von Thymus- und

Milzzellen der Ratte bei 43°C: Tempel u. Spath, 1987) beschleunigt sich die Nucleoidsedimentation. Als Ursachen kommen vor allem eine verhältnismäßig rasch einsetzende Erhöhung des Proteingehalts und "cross-links" innerhalb der nucleären Chromatinfraction in Betracht (91, 6, 16). Zu den unmittelbaren biochemischen Folgen gehören u.a. eine Verminderung der Verfügbarkeit der DNA für Enzyme (91) und umfangreiche Störungen im Stoffwechsel der Nucleinsäuren und Proteine. Hyperthermie wirkt zytotoxisch und strahlensensibilisierend (89).

5.2.2. Röntgenstrahlen

Ionisierende Strahlen erzeugen an der DNA u.a. Einzel- und Doppelstrangbrüche, die von Säugetierzellen ganz oder teilweise repariert werden können (85).

Der Reparaturablauf von Einzelstrangbrüchen erfolgt in 2 Phasen, die ohne großen Energieaufwand ablaufen. Die rasch einsetzende Reparaturphase, die von der DNA-Ligase abhängig ist, hat eine Halbwertszeit von wenigen Minuten, während die langsame, von der DNA-Rekombination abhängige Reparaturphase, eine Halbwertszeit von 10-30 min aufweist (85, 49, 8). Doppelstrangbrüche werden langsamer repariert. Jedoch kann auch hier nach 10 min die Hälfte der entstandenen Brüche repariert sein. Die durch ionisierende Strahlen ausgelöste Reparatur wird als "Kurzkettenreparatur" (engl. "short patch-repair") bezeichnet, da während der Reparatur nur wenige

Nucleotide im Bereich der Strangbrüche erfaßt werden (82). COOK und BRAZELL isolierten Kerne aus menschlichen HeLa-Zellen, bestrahlten sie mit Gammastrahlen-Dosen zwischen 60 und 1080 cGy und sedimentierten sie daraufhin sofort im neutralen Saccharosegradienten. Die Sedimentation wurde dosisabhängig langsamer. Mit Dosen über 1000 cGy konnte keine weitere Sedimentationsverlangsamung erzielt werden. Eine vergleichbare dosisabhängige Verlangsamung der Nucleoidsedimentation wurde auch von anderen Autoren (42, 59) festgestellt, die entweder HeLa-Zellen oder normale menschliche Lymphozyten Röntgenstrahlen-Dosen zwischen 50-1000 cGy ausgesetzt hatten. Sowohl nach Röntgen- als auch nach Gamma-Bestrahlung entstehen Strangbrüche an der DNA; dadurch bekommen die Nucleoide eine "offenere Struktur" und sedimentieren folglich langsamer. Werden z.B. aus menschlichen HeLa-Zellen isolierte Kerne geringen Gammastrahlen-Dosen ausgesetzt, so entstehen an der DNA Einzelstrangbrüche, die zum Verlust der superhelikalen Windungen der DNA führen. Die DNA wird also offener und weniger kompakt. Bei Dosen über 1000 cGy wird offenbar ein Schädigungsgrad erreicht, bei dem alle superhelikalen Windungen der DNA aufgehoben sind. Die Abnahme der Sedimentationsgeschwindigkeit von Nucleoiden nach Gammastrahlen-Exposition ist, wenn überhaupt, nur zu einem äußerst geringen Teil auf den Verlust von Proteinen oder DNA aus den Kernen zurückzuführen (14). Auch bei Mausthymuszellen zeigt sich bei Gamma-Bestrahlung im Dosisbereich von 100-2000 cGy und unmittelbar da-

rauf folgender Nucleoidsedimentation eine dosisabhängige Abnahme der Sedimentationsrate, wobei die Verlaufskurve asymptotische Form annimmt (93).

LANGROCK setzte menschliche Lymphozyten in vitro Gammastrahlen-Dosen zwischen 20 cGy und 1000 cGy aus. Dabei war sowohl ohne als auch mit "Repairinkubation" eine dosisabhängige Verlangsamung der Nucleoidsedimentation festzustellen, die jedoch im Herbst ausgeprägter war als im Sommer. Nach LANGROCK besteht die Notwendigkeit standardisierter Kultivierungsbedingungen für die Lymphozyten, damit gleiche Zellzyklusphasen vorliegen. Auch wäre eine Trennung von B- und T-Lymphozyten wünschenswert, da die Nucleoide unterschiedlich sedimentieren (30).

Die getrennte Gamma-Bestrahlung (0,5-6 Gy) von B- und T-Lymphozyten führten van RENSBURG et al. durch und stellten eine größere Strahlenempfindlichkeit der B-Lymphozyten fest; als Erklärung wurde an eine größere Anzahl von großen Domänen gedacht (52). Eine Domäne ist eine Schleife oder ein Bereich der DNA (Quartärstruktur) eines Genoms mit zahlreichen superhelikalen Windungen (Tertiärstruktur); eine Schleife entsteht dadurch, daß die DNA Verbindungen mit RNA und Proteinen eingeht. Ein Zellkern von HeLa-Zellen enthält etwa 10 000 Domänen mit einem Molekulargewicht von 10^9 Daltons pro Domäne (14, 4).

FILIPPOVICH et al. setzten Nucleoide aus Thymozytenfraktionen Gammastrahlen-Dosen zwischen 50 cGy und 2000 cGy aus. Sowohl die Nucleoide von großen als auch die von kleinen Lymphozyten

zeigten nach Strahlenexposition dosisabhängig eine Sedimentationsverlangsamung, wobei die maximale Sedimentationsverlangsamung bei den großen Lymphozyten nach 900 cGy und bei den kleinen Lymphozyten nach 1500 cGy erreicht war. Die dabei dosisabhängig erzielten Sedimentationskurven wurden im Sinn von 3 selbständigen übergewundenen Bereichen (Domänen) innerhalb der Nucleoide der jeweiligen Zellfraktion gedeutet (18). Abgesehen von der maximalen Sedimentationsverlangsamung reagieren die kleinen Lymphozyten insofern empfindlicher, als ihre Sedimentationsrate nach Exposition mit der gleichen Strahlendosis stärker zurückgeht als die der großen Lymphozyten; es wird vermutet, daß sich die Relaxation von "großen Domänen" - die großen Lymphozyten haben kleinere Domänen - deutlicher bemerkbar macht und Strahlenschäden in großen Lymphozyten schneller repariert werden als in kleinen (18).

OLIVE et al. (47) setzten V79-Zellen des chinesischen Hamsters Röntgenstrahlen-Dosen zwischen 100-800 cGy aus; durch die sofort nach Bestrahlung stattgefundene Nucleoidsedimentation ließ sich feststellen, daß die Zellen, die in einer Schicht gewachsen waren (Monolayer), offenbar empfindlicher sind als die Zellen, die in einer Suspension wuchsen und dabei Haufen bildeten. Dies wird darauf zurückgeführt, daß die zuletzt genannte Zellart "kleinere Domänen" oder DNA-Schleifen besitzt (47).

Der von verschiedenen Autoren festgestellte Sättigungseffekt der Nucleoidsedimentationskurve nach Röntgen- oder

Gammabestrahlung ist bei den einzelnen Zellarten nach annähernd der gleichen Dosis festzustellen. So lag er bei 500 cGy, als Thymuszellen von Ratten mit Gamma-Dosen zwischen 30 und 1020 cGy bestrahlt wurden und die Nucleoidsedimentation sofort nach Exposition erfolgte (14, 52, 85). In Analogie zu den oben aufgeführten Befunden führten die mit der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Röntgenstrahlendosen von 114 cGy bzw. 61,75 cGy zu einer signifikanten Verminderung der Nucleoidsedimentation.

Trotz einer geringen Differenz zwischen den Bestrahlungsdosen von Versuch Nr. 1 und Nr. 2 zeigten die bestrahlten Nucleoide doch deutliche Sedimentationsunterschiede gegenüber den Kontrollen. Die in der Literatur beschriebene und an der DNA-Synthese gemessene größere Reparaturkapazität von Thymuszellen im Vergleich zu Milzzellen nach Röntgenstrahlenexposition konnte mit der Nucleoidsedimentation vorliegend nicht bestätigt werden (82).

5.2.3. Ethidiumbromid (EB)

EB, 2,7-Diamino-10-äthyl-9-phenyl-phenanthridium-bromid, bindet zwischen komplementären Basenpaaren interkalierend an die DNA. Dadurch wird der Abstand zwischen den betroffenen Basenpaaren vergrößert, wobei die superhelikale (überspiralige) Struktur der DNA verloren gehen kann (94, 49). Die negativen superhelikalen Windungen der DNA werden dabei im Dosisbereich von 1-3 μg EB/ml aufgelöst. Ist die EB-Dosis groß genug ($>10 \mu\text{g/ml}$ EB), wird der maximale

Relaxationspunkt überschritten, und die DNA bildet eine neue positive Superhelix, d.h. sie verfestigt sich wieder. EB eignet sich als Chemotherapeutikum bei verschiedenen mikrobiellen Infektionen, da es bevorzugt an zirkulär geschlossener DNA angreift, die reverse Transkriptase hemmt und sich in Mikroorganismen anreichert (84, 94).

EB trennt die vier Histonfraktionen (H2A, H2B, H3, H4) von der DNA ab. Die Interkalation von EB führt somit auch zum Verlust von Nucleosomen. Die abgespaltene Histonmenge ist abhängig von der EB-Konzentration und erreicht ihr Maximum, wenn alle negativen Superhelices entfernt sind (4). Durch Vorinkubation mit EB in einer Dosis von 3 $\mu\text{g/ml}$ kann man die DNA somit maximal "relaxieren". Wie aus Abb.2 Versuch Nr. 4 ersichtlich ist, war die DNA am Ende eines Kontrollversuches noch relativ deutlich relaxiert. Der hohen EB-Konzentration im Saccharosegradienten gelang es nur unvollständig, die durch 3 $\mu\text{g/ml}$ stark relaxierte DNA (94) in eine deutlich kompaktere Form mit rechtsgewundenen Superhelices überzuführen. Der relativ geringe Unterschied zwischen nicht bestrahlten Kontrollen und röntgenbestrahlten Versuchsproben (vgl. Abb.2 Versuch Nr. 5) ist so zu erklären:

Aufgrund der Vorinkubation mit EB war die Zelle in der Lage, den durch Bestrahlung gesetzten Strahlenschaden schneller zu reparieren, d.h., die total relaxierte DNA war für die Reparaturenzyme leichter zugänglich. Durch die Bestrahlung werden aber nicht nur die Reparaturenzyme,

sondern auch die Mechanismen stimuliert, die gemeinsam mit dem EB die Induktion positiver rechtsgewundener Superhelices induzieren.

5.2.4. 3-Aminobenzamid (3-AB)

3-AB ist ein Hemmstoff des Enzyms Adenosindiphosphoribosyltransferase (ADPRT), das in Säugetierzellen für die Synthese von Poly-Adenosin-diphosphoribose (pADPr) aus Nicotinamidnucleotid (NAD^+) verantwortlich ist. pADPr soll für die Ligasereaktion bei der Verknüpfung neu synthetisierter DNA-Stränge im Rahmen der Reparaturphase notwendig sein. Es bestehen allerdings zellspezifische Besonderheiten. Die Aktivität der ADPRT steigt, wenn die DNA geschädigt wird, d.h., vor allem nach DNA-Strangbrüchen. In diesem Fall wird verstärkt pADPr gebildet, was zur Folge hat, daß der intrazelluläre NAD^+ -Spiegel sinkt (82, 17, 12). Werden beispielsweise sich-differenzierende Muskelzellen oder ruhende Lymphozyten vor der Nucleoidsedimentation mit 3-Aminobenzamid inkubiert, kommt es zu einer Anhäufung der sich physiologisch bildenden DNA-Strangbrüche; daher sinkt die Sedimentationsrate dieser Nucleoide (17). Die DNA-Reparatursynthese wurde bei den vorliegend beschriebenen Versuchen durch den ADPRT-Hemmstoff 3-Aminobenzamid nicht so beeinflusst, daß - verglichen mit Versuch Nr. 2 - ein größerer Sedimentationsunterschied zwischen Kontroll- und Versuchsnucleoiden entstanden wäre.

5.2.5. 1-β-D-Arabinofuranosylcytosin-,3',5'-Dideoxythymidin-Gemisch und Röntgenstrahlen

Von außen zugeführtes araC wird in der Zelle zu araC-Triphosphat umgewandelt, das kompetitiv Desoxycytidintriphosphat verdrängt und in die neu zu bildenden Polynucleotidstränge eingebaut wird. Dadurch werden die DNA-Elongation (vor allem DNA-Polymerase α vermittelt) und die Initiation der DNA-Synthese gehemmt. AraC besitzt aber auch eine geringe Hemmwirkung gegenüber der DNA-Polymerase β (49, 87), einem Enzym, das vor allem mit der DNA-"Kurzkettenreparatur" in Verbindung gebracht wird. AraC allein bewirkt in einer Konzentration von 4×10^{-4} mol/l nach Röntgenbestrahlung von Thymuszellen mit 10,2 Gy in vitro an den Nucleoiden nur eine Sedimentationsverlangsamung von etwa 10% (85). Ähnlich äußern sich ALDENHOFF et al., die von einem vernachlässigbaren Hemmeffekt der Verbindung auf die durch Röntgenstrahlen induzierten DNA-Reparatur sprechen (1). Bei den vorliegenden Versuchen konnten die Hemmstoffe bei der DNA-Polymerase (araC und ddT) den Bestrahlungseffekt von 61,75 cGy nicht vergrößern. Das Gegenteil war der Fall; im Vergleich zu Versuch Nr. 3, wo bestrahlte Zellen ohne Zusatz eines Agens zentrifugiert wurden, verkleinerte sich der Abstand von Versuchs- und Kontrollnucleoiden bei beiden Zellarten auf etwa 10%.

5.2.6. Novobiocin

Als "DNA-Topoisomerasen" wird eine Gruppe von ubiquitär vor-

kommenden Enzymen bezeichnet, die in DNA-Molekülen die Zahl der Windungen eines Stranges um den anderen erhöhen oder erniedrigen und damit die superhelikale Tertiärstruktur der DNA beeinflussen. Zahlreiche biochemische Reaktionen, an denen die DNA unmittelbar beteiligt ist, werden durch die Tertiärstruktur der DNA beeinflusst. Als Beispiel ist auf die DNA-Verdoppelung und bestimmte Reparaturphänomene zu verweisen (60, 90). Um näheren Aufschluß über die Bedeutung von Topoisomerasen für DNA-Stoffwechselvorgänge zu erhalten, wurden Topoisomerase-Hemmstoffe, wie Novobiocin oder Nalidixinsäure, in die experimentelle Medizin eingeführt (60,90).

Wird der Einfluß solcher Topoisomerase-Hemmstoffe mit Hilfe der Nucleoidsedimentation untersucht, ist zu erwarten, daß die zunehmende DNA-Kompaktierung zu einer Verlängerung der Sedimentationsstrecke führt. Eine Bestätigung bietet das Verhalten von Milz- und Thymusnucleoiden nach Einwirkung von Novobiocin in vitro (Tab.2, Abb.2). Durch ionisierende Strahlen induzierte Strangbrüche lockern die DNA-Struktur - nicht-enzymatisch - auf und "antagonisieren" somit die Novobiocin-Wirkung (Tab.2, Abb.2). Mit einer Verdeutlichung des Strahleneffektes durch in vitro-Einsatz von Topoisomerase-Hemmstoffen ist nach den o.a. Ergebnissen allerdings nicht zu rechnen.

5.3. In vivo-Versuche

In Versuchen zur Zeitabhängigkeit wurde festgestellt, daß sich an Milz- und Thymuslymphozyten eine Ganzkörper-röntgenbestrahlung mit 760 cGy dann am besten nachweisen ließ, wenn die für die Nucleoidsedimentation benötigten Lymphozyten entweder sofort oder 6 h nach Strahlenexposition gewonnen wurden.

Nachdem die günstigsten Zeitpunkte für die Entnahme von Milz und Thymus nach Ganzkörper-röntgenbestrahlung ermittelt waren, folgten Versuche zur Dosisabhängigkeit. Hierbei ergab sich, daß auch bei sofort nach Strahlenexposition stattfindender Organentnahme an Thymozyten erst Dosen von 760 cGy und 1520 cGy signifikant nachgewiesen werden konnten. Wurden die Thymi dagegen erst 6 h nach Bestrahlung entnommen, hatten noch wesentlich kleinere Dosen (≥ 190 cGy) signifikante Wirkungen. Die Signifikanz war im letzten Fall allerdings nicht durch die Lage der etwa 1 cm breiten Hauptbanden, sondern durch das Auftreten von Extrabanden direkt unterhalb des Flüssigkeitsmeniskus im EB-haltigen Saccharosegradienten gegeben.

5.3.1. Vergleich der in vivo-Versuche mit den in vitro-Versuchen

Mit der Nucleoidsedimentation können in vitro geringere Röntgenstrahlen-Dosen nachgewiesen werden als in vivo. Werden Rattenthymozyten sofort nach Strahlenexposition in vitro der Nucleoidsedimentation ausgesetzt, so ist

noch eine Strahlendosis von 30 cGy nachweisbar (85). Nach Ganzkörperbestrahlung von Ratten zeigen Thymusnucleoide dagegen erst nach einer Dosis ≥ 190 cGy nachweisbare Effekte unter der Voraussetzung, daß die Entnahme des Thymus einige Stunden (hier 6 h) nach Strahlenexposition erfolgt. In der Literatur liegen Mitteilungen über den Nachweis von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung oder UV-Licht in vivo mit Hilfe der Nucleoidsedimentation bisher nicht vor. Insgesamt fielen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei Veröffentlichungen über in vivo-Versuche auf, bei denen die Nucleoidsedimentation eingesetzt wurde. In diesen Fällen wurden aber DNA-Schäden nachgewiesen, die durch chemische Karzinogene verursacht worden waren (32, 53). Außerdem fand bei allen bisher veröffentlichten Ergebnissen über Versuche, bei denen Strahlenschäden mit Hilfe der Nucleoidsedimentation erfaßt worden waren, die Zeitabhängigkeit der Veränderungen keine systematische Berücksichtigung.

Vergleicht man somit nur die in vitro- und in vivo-Versuche, bei denen Thymozyten unmittelbar nach Strahlenexposition der Nucleoidsedimentation ausgesetzt wurden, so fällt auf, daß bei Bestrahlung in vivo erst eine mindestens 6,4fach größere Röntgenstrahlen-Dosis (190 cGy) signifikante Wirkungen hatte. Da die Thymuszellen in vitro und unter analogen Bestrahlungsbedingungen in vivo vergleichbare Strahlendosen absorbieren, müssen in vivo noch Mechanismen ablaufen, die einen bestimmten Anteil der Strahlenschäden beseitigen.

Hier ist vor allem an DNA-Reparaturvorgänge zu denken, da bei den in vitro-Versuchen durch Bestrahlung der Zellen auf Eis - wie in Abschnitt 5.2.2. erwähnt - insbesondere die rasche Komponente der Reparatursynthese unmittelbar gehemmt wird. Die große Diskrepanz der Nachweisgrenzen des unmittelbaren Strahlenschadens zwischen in vitro- und in vivo-Versuchen überrascht somit nicht.

Werden die Thymi aber erst 6 h nach Strahlenexposition in vivo entnommen, kann noch eine Röntgendosis im Bereich von 190 cGy nachgewiesen werden. Dies liegt offenbar daran, daß 6 h p.i. im Vergleich zu sofortiger Organentnahme zahlreiche sekundäre biochemische und morphologische Veränderungen eingetreten sind, die zu diesem Zeitpunkt den primären Strahlenschaden stärker in Erscheinung treten lassen. Die Nucleoide, die dann der Sedimentation unterworfen werden, können keine DNA mehr enthalten, die noch Anzeichen direkter Strahlenwirkung zeigt, da genügend Zeit für den Ablauf der DNA-Reparaturphasen zur Verfügung stand. Vielmehr werden jetzt sekundäre Strahlenwirkungen auf die DNA gemessen. Dazu gehören vor allem biochemische Veränderungen am Thymus (s. Teil 2.2.3.1.4. der Arbeit), die den morphologisch-histologischen vorausgehen. Es ist vor allem daran zu denken, daß die Chromatinveränderungen ihr Maximum 6-8 h p.i. erreichen (71, 61). Durch das Auftreten von Chromatinuntereinheiten, die denen gleichen, die nach Einwirkung von Mikrokokken-Nuclease entstehen, wird die Hypothese bekräftigt, daß die einige Stunden nach Ganzkörperbestrahlung nachweisbaren DNA-Läsionen sekundär enzymatischer

Natur sind (71).

Histologisch stellt sich der Thymus 6 h p.i. folgendermaßen dar: Der Thymus hat an Gewicht verloren, weil intakte Zellen sowohl aus Mark als auch Rinde ausgewandert sind. Parallel mit der Erhöhung des Anteils an pyknotischen Lymphozyten und an Zellfragmenten ("apoptotische Körperchen"), die während der von 3h-6h p.i. dauernden Zelluntergangsphase vor allem in der Rinde erscheinen, geht die Abnahme der Zahl der ungeschädigten Zellen einher. Im Mark ist die Zahl der Plasmazellen und der lymphoiden Retikulumzellen gestiegen (22, 7, 46).

Angesichts der in den ersten Stunden nach Strahlenexposition somit in vivo ablaufenden bevorzugt katabolen Prozesse ist die Verlängerung der Nucleoid-Sedimentationsstrecke umso überraschender, als eine Sedimentationsbeschleunigung eher auf einen anabolen Prozeß, d.h., auf größere Kompaktheit des Komplexes hinweist. Dabei ist an zelluläre und subzelluläre Phänomene zu denken.

5.3.2. Zelluläre und subzelluläre Phänomene der Sedimentationsbeschleunigung

Bei der Bestimmung der Zellkonzentration gemäß Abschnitt 3.3.2. der Arbeit fiel auf, daß nicht nur lichtmikroskopisch intakte, sondern auch karyorhektische und pyknotische Kerne vorhanden waren. Da als Grundlage der Zelleinstellung für die Nucleoidsedimentation intakte und geschädigte ganze

Zellen von Kontroll- und Versuchsproben gezählt und die gleichfalls in der Suspension vorhandenen morphologisch veränderten Zellkerne (z.B. pyknotische und karyorhektische Kerne, deren Zahl 6 h p.i. dosisabhängig zunahm, nicht von den lichtmikroskopisch intakten ganzen Zellkernen abgetrennt wurden, ist mit einem versuchsbedingt höheren Gesamt-DNA-Gehalt der Versuchsproben zu rechnen. Dies wurde durch die Bestimmung des DNA-Gehaltes aller Proben bestätigt. Diese gegenüber den Kontrollproben höheren DNA-Gehalte führten zu einer dosisabhängigen Beschleunigung der Nucleoidsedimentation (Abb.5). Wie bereits im Abschnitt 4.2.5. mitgeteilt, ist die um 25% (760 cGy) bzw. 45% (1520 cGy) schnellere Nucleoidsedimentation der Versuchsproben, im Vergleich zu den Kontrollen, nicht allein durch die Zunahme der DNA-Gehalte zu erklären. Hier kommt somit noch eine strahlenspezifische subzelluläre Wirkung zur Geltung, die dazu führt, daß auch vergleichbare DNA-Mengen von Kontroll- und Versuchsproben unter identischen Zentrifugationsbedingungen unterschiedlich schnell sedimentieren. Die physikalisch-chemische Ursache dieses Verhaltens kann nur darin liegen, daß verschieden starke Bremskräfte bzw. Reibungswiderstände in den Vergleichsproben vorhanden sind, die ihrerseits u.a. von der Tertiär- und Quartärstruktur der DNA abhängen und um so kleiner sind, je kompakter die DNA ist. Auf den vorliegenden Fall bezogen heißt das, daß die Bestrahlung zum Testzeitpunkt zu einer Verkleinerung des Nucleoidvolumens bzw. zu einer Kondensation der DNA geführt haben muß. Dies

ist aber genau das Gegenteil des Vorganges, der sofort nach Bestrahlung feststellbar ist und über DNA-Strangbrüche zur Auflockerung der DNA-Struktur und damit zu einer verzögerten Nucleoidsedimentation führt. Eine Verkleinerung des DNA-Volumens bzw. eine Verfestigung des Nucleoidkomplexes ist u.a. durch die Bildung von "cross-links" möglich. Hierbei handelt es sich einerseits um Vernetzungen zwischen Nucleinsäuren (die auch durch chemische Agentien, wie z.B. Mitomycin C, hervorgerufen werden können) und andererseits um solche zwischen Nucleinsäuren und Proteinen, die z.B. nach Einwirkung von ionisierender Strahlung, UV-Licht oder chemischen Agentien, wie z.B. 8-Methoxypsoralen oder cis-Dichlordiamin-platin, entstehen (73, 12, 92, 49).

Ionisierende Strahlung und/oder UV-Licht bewirken dabei, daß die DNA und Proteine eine enge Verbindung - vermutlich kovalente Bindungen - eingehen, die sich nicht durch organische Säuren, hohe Salzkonzentrationen oder alkalische Bedingungen, sondern lediglich durch proteolytische Enzyme aufbrechen lassen (12).

Das für die Beseitigung von "DNA-Protein-cross-links" am häufigsten eingesetzte proteolytische Enzym ist Proteinase K (49, 37, 12, 29).

Die allgemein übliche Proteinase K-Konzentration von 0,5 mg/ml hatte auch im vorliegenden Fall die stärkste Auswirkung, nämlich eine Reduktion der Nucleoidsedimentation um 20% gegenüber den ebenfalls bestrahlten Vergleichsproben. Eine Erhöhung der Proteinase K-Konzentration brachte keinen

größeren Vorteil.

Damit scheint erwiesen, daß insbesondere Vernetzungen zwischen DNA und Protein, d.h. "cross-links", an der Beschleunigung der Nucleoidsedimentation nach Strahlenexposition mit 760 cGy bzw. 1520 cGy in vivo beteiligt sind.

5.3.3. Nucleoidbanden besonders geringer Sedimentierbarkeit ("Extrabanden")

In der Literatur gibt es bisher keine Hinweise auf das gleichzeitige Phänomen der Sedimentationsbeschleunigung und des Auftretens der Extrabanden. Wie unter 4.2.3. erwähnt, sind diese fluoreszierenden Ringe direkt unterhalb des Flüssigkeitsmeniskus der Versuchsproben schon bei niedrigeren Bestrahlungsdosen zu sehen als die Sedimentationsbeschleunigung. Bei den hier beschriebenen Versuchen wird die DNA der bestrahlten Thymozyten durch die Zentrifugation in zwei ungleiche Teile zerlegt (vgl. 5.3.). Der weitaus Überwiegende Teil der DNA befindet sich in der Hauptbande (96%), der kleinere Teil bildet die Extrabande (4%). Bei dieser Gelegenheit sei daran erinnert, daß erstmalig COLE und ELLIS (68) an der Milz von Mäusen sowie im Rattenknochenmark und RYSINA (68) bei Kaninchen nach Bestrahlung mit Dosen größer als die LD_{50-100} die Bildung von freier DNA oder PDN feststellten. Der andere Teil der DNA blieb in Form von DNP gebunden. Mit der gleichen biochemischen Methode aber geringeren Strahlendosen erzielten SKALKA et al. (68) bei in vivo-Versuchen mit Milz und Thymus

von Mäusen und mit Knochenmark von Ratten ähnliche Resultate. So nahm der Anteil an freier DNA 4 h nach Röntgenbestrahlung in der Milz von Mäusen und im Knochenmark von Ratten im Dosisbereich von 0-285 cGy linear zu, während im Dosisbereich von 285-570 cGy keine weitere Zunahme erfolgte. Die "freie DNA" betrug nur einen Bruchteil der in DNP enthaltenen DNA (72, 68). Diese Ergebnisse zeigen deutliche Parallelen zu den Ergebnissen, die in der vorliegenden Arbeit erzielt wurden, und legen auch insoweit die Annahme nahe, daß es sich bei den "Extrabanden" um "freie DNA" handelt. Aber noch weitere Gründe sprechen für diese Hypothese.

Ursprünglich wurde von COLE und ELLIS eine 0,14 molare NaCl-Lösung verwendet, um nach Strahlenexposition in vivo freie DNA aus DNP herauszulösen. Aber auch normales Wasser hätte diesen Zweck erfüllt (13). Da die Zusammensetzung des Lösungsmittels somit für die Freisetzung von DNA aus bestrahltem Chromatin von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint, ist es wahrscheinlich, daß auch bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen bei Aufbereitung der Zellen PDN in die lösliche Phase übergingen.

Außerdem fällt der Zeitpunkt der Organentnahme (6 h p.i.) in die Zeitspanne (4-8 h p.i.), bei der Maximalwerte der PDN-Freisetzung im Thymus erreicht werden (72). Ergänzend ist darauf hinzuweisen, daß das Maximum der PDN-Freisetzung im allgemeinen immer dann erreicht ist, wenn Pyknosen auftreten (72). Da in Versuchen, bei denen der Farbstoff Ethidiumbromid durch Bisbenzimid ersetzt wurde, keine Extra-

bande zu sehen war, muß man folgern, daß DNA durch Bisbenzimid nur angefärbt wird, wenn der Komplex durch Nucleoproteine in einem bestimmten DNA-Protein-Verhältnis stabilisiert wird. Reagiert Bisbenzimid nicht, bedeutet dies, daß der Nucleoproteinanteil nicht oder nicht in dem entsprechenden Verhältnis vorhanden ist, woraus gleichfalls auf freie DNA oder PDN geschlossen werden kann. Die Lage der Extrabanden dicht unterhalb des Flüssigkeitsmeniskus deutet auf eine geringere Dichte der DNA hin. Auch dies ist charakteristisch für freie DNA.

Die verstärkte Freisetzung von PDN aus dem Chromatin ist eine sekundäre Strahlenwirkung, weil sie nicht sofort nach Bestrahlung erfolgt. Es besteht allgemeine Übereinstimmung darüber, daß die Bildung freier DNA sowohl in vitro als auch in vivo durch Nucleasen hervorgerufen wird (34, 43). Über deren Natur und Lokalisation besteht allerdings noch Uneinigkeit. Während NIKONOVA et al. (43) eine $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonuclease für den internucleosomalen DNA-Abbau in Rattenthymozyten verantwortlich machen, verneinen MATYASOVA et al. die Beteiligung von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängiger Endonuclease, DNase I und DNase II an diesem Vorgang in Mäusethymozyten (34). Die exakten Mechanismen, die zur Aktivierung dieser Nucleasen führen, sind noch unbekannt.

Bisher wurde der Nachweis, daß die Bildung freier DNA d.h. die sekundäre Strahlenwirkung durch Nucleasen verursacht wird, mit Hilfe der Elektrophorese geführt. Dieser Nachweis ist jetzt auch indirekt mit der Nucleoidsedimenta-

tion geführt.

Wie aus Abschnitt 4.1.1. der Arbeit ersichtlich ist, können nach Anwendung von Hyperthermie an Rattenthymozyten bei der Nucleoidsedimentation die gleichen Phänomene wie nach Röntgenbestrahlung auftreten. Die daraus ableitbaren Wirkungsanalogien sind insofern bemerkenswert, als Hyperthermie gegenüber ionisierenden Strahlen sensibilisiert.

5.4. Schlußfolgerungen

Am Sedimentationsverhalten von Nucleoiden von in vivo röntgenbestrahlten Thymozyten sind die folgenden Phänomene ablesbar: Unmittelbar nach Exposition vermindert sich die superhelikale DNA-Struktur. Diese Veränderung wird erst nach mittelletalen Dosen deutlich und spiegelt die bis zum Analysenzeitpunkt nicht reparierten Strangbrüche wider. Einige Stunden nach Exposition sind DNA-Abbauprodukte und "DNA-Protein-cross-links" nachweisbar. Beide Phänomene erscheinen erst, wenn Kernpyknosen im Lichtmikroskop sichtbar werden. Nimmt die Zahl der Pyknosen zu, erhöht sich zum einen die nur über die Bildung von "cross-links" zu erklärende Sedimentationsbeschleunigung, und zum anderen wird mehr "freie DNA" gebildet (72). Eine funktionelle Verknüpfung beider Phänomene könnte darin gesehen werden, daß es sich bei den über "cross-links" an die DNA gebundenen Proteinen um "Nekrolyseenzyme", z.B. DNasen handelt, welche in den pyknotischen Kernen zu Abbauvorgängen mit der Freisetzung von DNA bzw. PDN führen. Da die Bildung von cross-links

(Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters) durch Cycloheximid, einem Proteinsynthesehemmstoff, in vitro nicht beeinflusst werden konnte (12), sind o.a. Vorgänge an präformierte Proteine gebunden und somit von der Neubildung von Proteinen unabhängig. Welche Bedeutung dem o.a. Phänomen für den Mechanismus des "Interphasetodes" nach Strahleneinwirkung zukommt, muß Gegenstand weiterer Untersuchung bleiben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Nucleoidsedimentation wurde die Strahlenreaktion von Thymozyten unmittelbar sowie 6 h nach GKB^{a)} von Ratten mit Dosen von 190 cGy bis 1520 cGy untersucht. Zum Vergleich dienten Untersuchungen an Thymus- und Milzzellen nach Röntgenbestrahlung *in vitro*. Orientierende Analysen galten einem möglichen Koergismus von Röntgenstrahlen einerseits sowie Hyperthermie und Hemmstoffen der DNA-Synthese bzw. DNA-Reparatur (1- β -D-Arabinofuransyloctosin, 3', 5'-Dideoxythymidin, 3-Aminobenzamid, Ethidiumbromid und Novobiocin) andererseits.

Die wesentlichsten Ergebnisse können, wie folgt, zusammengefaßt werden:

- 1) Unmittelbar nach GKB von Ratten mit Dosen von 760 cGy war die Nucleoidsedimentation von Thymozyten verlangsamt.
- 2) Wurden die Thymozyten 6 h nach GKB von Ratten mit Dosen von ≥ 190 cGy gewonnen, war neben einer "Nucleoidhauptbande" eine Nucleoidfraktion geringer Sedimentierbarkeit als "Nucleoidnebenbande" nachweisbar, welche nicht von reiner, hochmolekularer DNA unterschieden werden konnte.
- 3) Zur Erhöhung der Sedimentation von Thymusnucleoiden kam es 6 h nach GKB von Ratten mit Dosen von ≥ 760 cGy. Diese Sedimentationsbeschleunigung war durch Zusatz von Proteinasen K zur Nucleoidpräparation aufhebbar.
- 4) Wurden Thymus- und Milzzellen *in vitro* röntgenbestrahlt, hatten noch Strahlendosen von 62 cGy eine signifikante Verminderung der Nucleoidsedimentation zur Folge. Durch die o.a.

a) Ganzkörperröntgenbestrahlung

Zusatznoxen wurde der Nachweis einer Strahlenschädigung nicht verbessert.

Aus den Ergebnissen folgt insbesondere:

- 1) Für den Nachweis von Strahlenexpositionen in vivo ist die Nucleoidsedimentation biochemischen Methoden unterlegen.
- 2) Einige Stunden nach subletaler Röntgenbestrahlung in vivo ist mit dem Auftreten von freier DNA bzw. Desoxyribopolynucleotiden zu rechnen. Gleichzeitig kommt es zu Brückenbildungen ("cross-links") innerhalb der Chromatinfraction.
- 3) Die Verminderung der Nucleoidsedimentation unmittelbar nach hochdosierter GKB von Ratten spiegelt primäre Strahlenschäden wider. Die einige Stunden nach Exposition nachweisbaren Veränderungen sind Ausdruck der im Zusammenhang mit dem "Interphasetod" von Thymozyten ablaufenden sekundären, enzymatischen Veränderungen und mit den gegenwärtigen Vorstellungen über die strahleninduzierte Apoptose der Zellen vereinbar.

SUMMARY

Sedimentation of nucleoids from thymus and spleen cells of rats after X-irradiation in vitro and in vivo.

The reaction to irradiation of thymocytes was tested immediately and 6 hours after whole body X-irradiation of rats with doses from 190 cGy up to 1520 cGy by nucleoid sedimentation. For comparison, examinations of thymus and spleen cells after X-irradiation in vitro were done. Preliminary analyses should find a possible coergism between X-rays on one side and hyperthermia and inhibitors of DNA-synthesis or DNA-repair (cytosinearabioside, dideoxythymidine, 3-amino-benzamide, ethidiumbromide, and novobiocine) on the other side.

The essential results may be summarized as follows:

- 1) The nucleoid sedimentation of thymocytes was reduced immediately after whole-body X-irradiation with doses of ≥ 760 cGy.
- 2) When thymocytes were assayed 6 hours after whole body irradiation of rats with doses ≥ 190 cGy, there was - beside a main nucleoid band - a smaller nucleoid band detectable; this band was of less sedimentability and couldn't be distinguished from pure, high molecular DNA.
- 3) The sedimentation rate of thymus nucleoids rose 6 hours after whole body irradiation with doses ≥ 760 cGy. This acceleration of sedimentation could be neutralized by addition of Proteinase K to the nucleoid preparation.

4) When thymus and spleen cells were X-irradiated in vitro, still an irradiation dose of 62 cGy induced a significant reduction of the nucleoid sedimentation. The detection of DNA damage following X-irradiation was not improved by the above mentioned additional noxious agents. From the results the following conclusions may be drawn:

1) With respect to the detection of in vivo effects of X-irradiation, the nucleoid sedimentation is less sensitive than biochemical methods.

2) Some hours after sublethal X-irradiation in vivo, free DNA and/or polydeoxyribonucleotides appear. At the same time cross-links can be detected in the chromatin fraction.

3) The reduction of the nucleoid sedimentation immediately after high doses of whole-body irradiation is the result of primary DNA lesions. The changes detectable some hours after are due to the secondary enzymatic changes, that are connected with the interphase death of thymocytes, and coincide with the present opinions about the irradiation induced apoptosis of cells.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aldenhoff, P. and K. Sperling:

Simultaneous demonstration of UV-type and ionizing radiation-type DNA repair by the nucleoid sedimentation technique.

Mutat. Res. 131, 137 - 142 (1984)

2. Altmann, K.J. und G.B. Gerber:

Lymphoid organs

pp. 49 - 75 in:

Radiation Biochemistry, Altmann, K.J., G.B. Gerber, S. Okada (Ed.), Vol II: Tissues and Body Fluids
New York, London, Academic Press (1970)

3. Beneš, L., J. Soška and Emilie Lukášova:

The acid-soluble deoxyriboside and deoxyribotide pool and deoxyribonucleic acid synthesis in haematopoietic tissues of normal and irradiated animals.

Fol. Biol. (Prag) 11, 123 - 133 (1965)

4. Benyajati, Ch. and A. Worcel:

Isolation, characterization and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*.

Cell 9, 393 - 407 (1976)

5. Betz, E.H.:

Morphologische Veränderungen des Lymphatischen Systems nach Bestrahlung.

pp. 29 - 36 in:

Die Strahlenwirkung auf das lymphatische System

Hrsg.: K.H. Kärcher und C. Streffer,

Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag (1974)

6. Bowden, G.T., M. Kasunic and A.E. Cress:
Thermal enhancement of X-ray induced DNA cross-linking.
Radiat. Res. 89, 203 - 208 (1982)
7. Braun, H.:
Beiträge zur Histologie und Zytologie des bestrahlten
Thymus.
Strahlentherapie 126, 236 - 246 (1965)
8. Bryant, P.E., R. Warring and G. Ahnström:
A comparison of results obtained by the unwinding
and nucleoid sedimentation methods.
Mutat. Res. 131, 19 - 26 (1984)
9. Carson, D.A., S. Seto, D.B. Wasson and C.J. Carrera:
DNA strand breaks, NAD metabolism, and programmed
cell death.
Exp. Cell. Res. 164, 273 - 281 (1986)
10. Charles, W.C. and J.E. Cleaver:
Comparison of nucleoid and alkaline sucrose gradients
in the analysis of inhibitors of DNA repair in human
fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 107, 250 - 257 (1982)
11. Čejková, M., M. Skalka and J. Matyášová:
The effect of radiation on deoxyribonucleoproteins
in animal tissues.
Fol. Biol. (Prag) 17, 189 - 195 (1971)
12. Chiu, S.-M., N.M. Sokany, L.R. Friedman and
N.L. Oleinick:
Differential processing of ultraviolet or ionizing
radiation - induced DNA-protein cross-links in
Chinese hamster cells.
Int. J. Radiat. Biol. 46, 681 - 690 (1984)

13. Chlumecka, V. and M. Skalka:
Solubilization of rat thymus and spleen deoxyribo-nucleoprotein in neutral salt solutions after irradiation in vivo.
Fol. Biol. (Prag) 12, 374 - 391 (1966)
14. Cook, P.R. and I.A. Brazell:
Supercoils in human DNA.
J. Cell Sci. 19, 261 - 279 (1975)
15. Cook, P.R. and I.A. Brazell:
Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA.
Nature 263, 679 - 682 (1976)
16. Cress, A.E. and G.T. Bowden:
Covalent DNA-protein crosslinking occurs after hyperthermia and radiation.
Radiat. Res. 95, 610 - 619 (1983)
17. Farzaneh, F., S. Shall and A.P. Johnstone:
The dynamic nature of DNA-strand breaks present in differentiating muscle cells and quiescent lymphocytes.
FEBS Letters 189, 62 - 66 (1985)
18. Filippovich, I.V., N.I. Sorokina, V.A. Soldatenkov and E.F. Romantzev:
Supercoiled DNA repair in thymocyte fractions differing in radiosensitivity.
Int. J. Radiat. Biol. 42, 31 - 44 (1982)
19. Flink, I. and D.E. Pettijohn:
Polyamines stabilise DNA folds.
Nature 253, 62 - 63 (1975)

20. Gelderblom, D., B.J. Smit and L. Böhm:
Effect of irradiation and endogenous nucleases on
rat liver chromatin.
Radiat. Res. 99, 363 - 371 (1984)
21. Haber, M. and B.W. Stewart:
Patterns of structural change in DNA during tissue
necrosis indicated by benzoyleated deae-cellulose
chromatography.
Chem.-Biol. Interact. 53, 247 - 255 (1985)
22. Hagen, U. und H. Braun:
Untersuchungen über die Entstehung der Thymusatrophie
nach Röntgenbestrahlung.
Strahlentherapie 116, 374 - 384 (1961)
23. Hecht, R.M., D. Stimpson and D. Pettijohn:
Sedimentation properties of the bacterial chromosome
as an isolated nucleoid and as an unfolded DNA fiber.
J. Mol. Biol. 111, 257 - 277 (1977)
24. Hollatz, R. and K. Tempel:
Unscheduled DNA - Synthesis in UV-irradiated spleen
lymphocytes of the rat after whole-body X-irradiation.
Radiat. Environm. Biophys. 15, 77 - 83 (1978)
25. Ivannik, B.P., R.V. Golubeva, V.I. Murzaev and
N.I. Rjabčenko:
Einfluß der Eiweißsynthese auf den Zerfall von DNS
und DNP in Thymozyten der Ratten nach der Bestrahlung
(Kurzübersetzung aus dem Russischen).
Radiobiologija 18, 803 - 809 (1978)
26. Karlson, P.:
Biochemie
11. Auflage
Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag (1980)

27. Kim, M.A., R. Happle and H. Traupe:
Lymphocyte proliferation and nucleoid sedimentation
in a case of premature aging distinct from Werner's
Syndrome.
Arch. Dermatol. Res. 278, 277 - 282 (1986)
28. Kulkarni, M.S. and K.L. Yielding:
DNA damage and repair in epithelial (mucous) cells
and crypt cells from isolated colon.
Chem.-Biol. Interact. 52, 311 - 318 (1985)
29. Lambert, Bo, Yu Chen, Sai-Mei He and Margareta Sten:
DNA cross links in human leucocytes treated with
vinyl acetate and acetaldehyde in vitro.
Mutat. Res. 146, 301 - 303 (1985)
30. Langrock, K.:
Verhalten der Nucleinsäure-Ethidium-Komplex-Sedi-
mentation menschlicher Lymphozyten nach Gammabe-
strahlung.
Radiobiol.-Radiother. 23, 301 - 308 (1982)
31. Leonhardt, H.:
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.
5. Auflage
Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1977)
32. Lipetz, P.D., D.E. Brash, L.B. Joseph, H.D. Jewett,
D.R. Lisle, L.E. Lantry, R.W. Hart and R.E. Stephens:
Determination of DNA superhelicity and extremely low
levels of DNA strand breaks in low numbers of
nonradiolabeled cells by DNA - 4',6 - Diamidino 2 -
phenylindole fluorescence in nucleoid gradients.
Analyt. Biochem. 121, 339 - 348 (1982)

33. Maisin, J., A. Dunjic and J.R. Maisin:
Radiation pathology of lymphatic system and thymus
pp. 496 - 541 in:
Pathology of Irradiation
Hrsg.: C.C. Berdjis, Baltimore, The Williams &
Wilkins Company (1971)
34. Matyášová, J., M. Skalka and M. Čejková:
On the degradation of chromatin to nucleosomes in
the thymocytes of X-irradiated mice.
Fol. Biol. (Prag) 30, 123 - 136 (1984)
35. Matyášová, J. and M. Skalka:
Interaction with heparin of deoxyribonucleoprotein
complex damaged in vivo by nitrogen mustards.
Biochem. Pharmacol. 17, 830 - 833 (1968)
36. Matyášová, J., M. Skalka, M. Čejková and G. Blažíček:
The effect of radiation on deoxyribonucleoproteins
in animal tissues.
Fol. Biol. (Prag) 17, 328 - 339 (1971)
37. Mayr, A.:
Wissenschaftliche Entwicklung auf Gebieten der
medikamentellen Steigerung der nichtantigenspezi-
fischen, körpereigenen Abwehr.
Tierärztl. Prax. 10, 451 - 463 (1982)
38. McGinnis, E., A.M. Sarraf and K.L. Yelding:
Involvement of deoxyribonuclease activity in the
differential sedimentation rates of nucleoids from
nontransformed and transformed mouse embryo fibro-
blasts.
Mech. Age. Develop. 22, 219 - 232 (1983)

39. Michel, S. and F. Laval:
Repair of γ -ray induced single-strand breaks in
human lymphocytes.
Biochimie 64, 749 - 751 (1982)
40. Milner, A.E. and A.T.M. Vaughan:
DNA strand breaks detected by laser scatter from
nucleoids.
Int. J. Radiat. Biol. 48, 457 (1985)
41. Mišúrová, E., M. Praslička, M. Skalka and L. Marko:
Influence of hypoxic hypothermia on the release of
polydeoxyribonucleotides from deoxyribonucleoprotein
complex in spleen and thymus of irradiated mice.
Stud. Biophys. 6, 439 - 444 (1967)
42. Mullenders, L.H.F., A.A. van Zeeland and A.T.
Natarajan:
Comparison of DNA loop size and super-coiled domain
size in human cell.
Mutat. Res. 112, 245 - 252 (1983)
42. Muller, M.T.:
Nucleosomes contain DNA binding proteins that resist
dissociation by sodium dodecyl sulfate.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 114, 99 - 106 (1983)
43. Nikonova, L.V., P.A. Nelipovich and S.R. Umansky:
The involvement of nuclear nucleases in rat thymocyte
DNA degradation after γ -irradiation.
Biochim. Biophys. Acta 699, 281 - 289 (1982)
44. Ohya, H., M. Shimizu and T. Yamada:
Prevention of interphase death in rat thymocytes
by bisulfite.
Radiat. Res. 95, 116 - 123 (1983)

45. Ohyama, H. and T. Yamada:
Reduction of rat thymocyte interphase death by
hyperthermia.
Radiat. Res. 82, 342 - 351 (1980)
46. Ohyama, H., T. Yamada, A. Ohkawa and I. Watanabe:
Radiation-induced formation of apoptotic bodies in
rat thymus.
Radiat. Res. 101, 123 - 130 (1985)
47. Olive, O.L., J. Hilton and R.E. Durand:
DNA conformation of Chinese hamsters V 79 cells and
sensitivity to ionizing radiation.
Radiat. Res. 107, 115 - 124 (1986)
48. Ostling, O. and K.J. Johanson:
Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA
damages in individual mammalian cell.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 123, 291 - 298 (1984)
49. Pfahler, W.:
Alkalische Elution von DNA aus Thymus und Milzzellen
der Ratte nach Einwirkung physikalischer und chemi-
scher Agentien in vitro.
Diss. med. vet. München 1983
50. Promwichit, P., M.G. Sturrock and I.V. Chapman:
Depressed DNase I inhibitor activity and delayed
DNA damage in X-irradiated thymocytes.
Int. J. Radiat. Biol. 42, 565 - 571 (1982)
51. Regel, K.:
Certain patterns of DNA double-strand breaks in
membrane attached superstructure units seem to cause
mammalian cell death.
Stud. Biophys. 103, 179 - 194 (1984)

52. Rensburg, E.J.v., W.K.A. Louw, H. Izatt and J.J. v.d. Watt:

DNA supercoiled domains and radiosensitivity of subpopulation of human peripheral blood lymphocytes. Int. J. Radiat. Biol. 47, 673 - 679 (1985)

53. Romagna, F., M.S. Kulkarni and M.W. Anderson:

Detection of repair of chemical-induced DNA damage in vivo by the nucleoid sedimentation assay. Biochem. Biophys. Res. Comm. 127, 56 - 62 (1985)

54. Rotter, W.:

Nekrose

pp. 65 - 72 in:

Lehrbuch der Pathologie für den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Band 1

2. Auflage

Hrsg.: W. Rotter

Stuttgart, New York, F.K. Schattauer Verlag (1978)

55. Sachs, L.:

Statistische Methoden

5. Auflage

Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag (1982)

56. Sandersleben, J.v.:

Zelltod/Nekrose

pp. 19 - 21 in:

Pathologische Histologie der Haustiere.

Hrsg.: J.v. Sandersleben, K. Dämmrich, E. Dahme

Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag (1981)

57. Sankaranarayanan, K., A.T. Natarajan, L.H.F.

Mullenders and J.L.S. van Rijn:

Effects of pre-treatment with sodium butyrate on the frequencies of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes.
Mutat. Res. 151, 269 - 274 (1985)

58. Schrek, R., S. Chandra, Z. Molnar and S. Stefani:

Two types of interphase death of lymphocytes exposed to temperatures of 37-45° C.
Radiat. Res. 82, 162 - 170 (1980)

59. Schwarz, K., I.J. Körner und K. Günther:

Determination of the molecular weight of supercoiled DNA subunits by sedimentation of nucleoids from X-irradiated normal and malignant human lymphocytes.
Stud. Biophys. 100, 149 - 159 (1984)

60. Sealy, L., M. Cotten and R. Chalkley:

Novobiocin inhibits passive chromatin assembly in vitro.
EMBO J. 5, 3305 - 3311 (1986)

61. Skalka, M.:

Some aspects on the degradation of macromolecules in lymphatic and hemopoietic tissues of irradiated animals.

International Atomic Energy Agency
Joint IAEA/WHO panel on biochemical indicators of radiation injury in men
(Paris 22 - 26 June) 1970

62. Skalka, M.:

The increased solubilization of thymus and spleen chromatin from irradiated mice by low deoxycholate concentrations.

Fol. Biol. (Prag) 20, 205 - 215 (1974)

63. Skalka, M., M. Čejková and J. Matyášová:

The sensitivity of chromatin from thymuses and spleens of irradiated mice to alkaline solutions.

Fol. Biol. (Prag) 22, 335 - 342 (1976)

64. Skalka, M. und M. Čejková:

Über die Interaktion von normalem und bestrahltem Deoxyribonucleoprotein mit Polyanionen.

Gemeinsame Jahrestagung 1968

Deutsche Gesellschaft für Biophysik e.V.

Österreichische Gesellschaft für reine und angewandte Biophysik; Baden bei Wien, September 1968

Separatum

Verlag der Wiener Medizinischen Akademie

65. Skalka, M. and J. Matyášová:

Post-irradiation changes in the deoxyribonucleoprotein complex in animal tissues as revealed by the action of heparin.

Nature 212, 1253 - 1255 (1966)

66. Skalka, M. and J. Matyášová:

The effect of radiation on deoxyribonucleoproteins in animal tissue.

Fol. Biol. (Prag) 13, 457 - 464 (1967)

67. Skalka, M. and J. Matyášová:

The increased sensitivity of the deoxyribonucleoprotein complex of irradiated tissues to the action of heparin.

Int. J. Radiat. Biol. 11, 193 - 196 (1966)

68. Skalka, M. and J. Matyášová:

The effect of low radiation doses on the release of deoxyribopolynucleotides in haematopoietic and lymphatic tissues.

Int. J. Radiat. Biol. 7, 41 - 44 (1963)

69. Skalka, M. and J. Matyášová:

The effect of radiation on deoxyribonucleoproteins in animal tissue.

Fol. Biol. (Prag) 11, 378 - 387 (1965)

70. Skalka, M., J. Matyášová and M. Čejková:

Structural and functional changes of chromatin under the influence of polyanions.

Stud. Biophys. 55, 105 - 112 (1976)

71. Skalka, M. J. Matyášová and M. Čejková:

DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments.

FEBS Letters 72, 271 - 274 (1976)

72. Skalka, M., J. Matyášová and V. Chlumecká:

The effect of radiation on deoxyribonucleoproteins in animal tissues.

Fol. Biol. (Prag) 11, 113 - 122 (1965)

73. Spath, A.:

Semikonservative und unprogrammierte (reparaturbedingte) Desoxyribonucleinsäuresynthese in Thymus- und Knochenmarkszellen der Ratte unter dem Einfluß von Diäthyldithiocarbamat (DDC).

Diss. med. vet. München (1985)

74. Stender, H.-St.:

Strahlenwirkung auf Zellen wichtiger Organe, Milz und Lymphknoten

pp. 149 - 180 in:

Strahlentherapie der Zelle

Hrsg.: E. Scherer und H.-S. Stender,

Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1963)

75. Suciú, D.:

Cellular death by apoptosis in some radiosensitive and radioresistant mammalian tissues.

J. theor. Biol. 105, 391 - 401 (1983)

76. Suciú, D. and Z. Uray:

Density of nuclear matrix isolated from some radiosensitive and radioresistant rat tissues.

Stud. biophys. 89, 229 - 234 (1982)

77. Suciú, D. and O. Bojan:

Autodigestion of chromatin in some radiosensitive and radioresistant mouse cells. Role of proteolysis and endonucleolysis.

Int. J. Radiat. Biol. 39, 273 - 279 (1981)

78. Suciú, D.:

Role of alkaline endonucleases in the release of soluble chromatin from thymus, spleen and liver nuclei of normal and irradiated mice.

Int. J. Radiat. Biol. 35, 119 - 131 (1979)

79. Suciú, D. and Z. Uray:

Alkaline endonuclease(s) activity in the thymus and spleen of normal and irradiated mice.

Int. J. Radiat. Biol. 32, 553 - 560 (1977)

80. Suliová, J. and E. Mišúrova:

Effect of X-irradiation on histones and DNA in rat thymus.

Radiobiol.-Radiother. 23, 667 - 674 (1982)

81. Tempel, K.:

Radiologie für Veterinärmediziner
Stuttgart, Enke Verlag 1983

82. Tempel, K.:

DNA-Reparaturvorgänge in Thymus- und Milzzellen der Ratte in vitro unter dem Einfluß des Poly (ADP-ribose)-Polymerase-Hemmstoffs 3-Aminobenzamid.

Zbl. Vet. Med. A. 32, 123 - 134 (1985)

83. Tempel, K. und Spath:

Desoxyribonucleinsäure (DNA)- Synthese von Thymus- und Milzzellen der Ratte in vitro nach Hyperthermie.

Strahlentherapie, im Druck

84. Tempel, K., A. Goette und I. Schmerold:

Unterschiede zwischen Milz- und Thymuszellen der Ratte in der Wirkung von Ethidiumbromid auf die unprogrammierte DNA-Synthese (DNA-Reparatursynthese) und die Nucleoid-sedimentation.

Z. Naturforsch. 39 c, 600 - 605 (1984)

85. Tempel, K., I. Schmerold und B. Kläger:

Die Nucleoidsedimentation - eine Methode zum Nachweis von DNA-Schäden und DNA-Reparatur - am Beispiel von Rattenlymphozyten nach Einwirkung physikalischer und chemischer Agentien in vitro.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 98, 3 - 7 (1985)

86. Tempel, K., I. Schmerold, W. Pfahler und A. Goette:

Vergleichende Untersuchungen zur DNA-Synthese von Thymus- und Milzzellen der Ratte in vitro unter dem Einfluß von Röntgenstrahlen, UV-Licht und radiomimetisch wirksamen Verbindungen.

Strahlentherapie 160, 386 - 393 (1984)

87. Tempel, K., M. Wulffius-Kock, J. Winkle und I. Schmerold:

Semikonservative und reparaturbedingte Desoxyribonucleinsäuresynthese in Rattenthymozyten unter dem Einfluß

einiger radioprotektiver und radiosensibilisierender Verbindungen.

Strahlentherapie 158, 112 - 122 (1982)

88. Trowell, O.A., M.J. Corp and W.R. Lush:

Paradoxical resistance of thymus lymphocytes to high doses of X-radiation.

Radiat. Res. 7, 120 - 128 (1957)

89. Van Beuningen, D.:

Hyperthermie als zytotoxisches und strahlensensibilisierendes Agens: Zelluläre Effekte.

Strahlentherapie 159, 60 - 66 (1983)

90. Vosberg, H.-P.:

DNA Topoisomerases: Enzymes that control DNA conformation.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 114, 19 - 102 (1985)

91. Warters, R.L., L.M. Brizgys, R. Sharma and J.L. Roti Roti:

Heat shock (45°C) results in an increase of nuclear matrix protein mass in HeLa cells.

Int. J. Radiat. Biol. 50, 253 - 268 (1986)

92. Weniger, P.:

Nucleoid sedimentation as a test system for DNA repair after different types of DNA-damage.

Progr. Mutat. Res. 4, 261 - 165 (1982)

93. Weniger, P.:

Eine Methode zum Nachweis von geringen Strahlenschäden in der DNA von eukariotischen Zellen.

Österreichische Studiengesellschaft für Atomenergie GmbH, Ber. No. 2990, (1978)

94. Worcel, A. and E. Burgi:

On the structure of the folded chromosome of
Escherichia Coli.

J. Mol. Biol. 71, 127 - 147 (1972)

95. Yamada, T., H. Ohyama, Y. Kinjo and M. Watanabe:

Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin
in rat thymocytes irradiated in vitro.

Radiat. Res. 85, 544 - 554 (1981)

96. Zhivotovsky, B.D., N.B. Zvonareva und K.P. Hanson:

Characteristics of rat thymus chromatin degradation
after whole-body X-irradiation.

Int. J. Radiat. Biol. 39, 437 - 440 (1981)

Herrn Prof. Dr. K. Tempel danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. A. Spath sowie den anderen Mitarbeitern des Instituts für wertvolle Ratschläge bei der Durchführung der Versuche.

L e b e n s l a u f

Rüdiger Heinzelmann	geb. am 7. Mai 1954 in Stuttgart
Eltern	Hellmut Heinzelmann, Regierungsgewerbebedirektor, verst. 1980 Margarete Heinzelmann, geb. Adermann Hausfrau, verst. 1979
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder (6J., 2J.)
Schulbesuch	1961 - 1965 Volksschule: Vogelsangschule, Stuttgart 1965 - 1973 Friedrich-Eugens-Gymnasium, Stuttgart
Wehrdienst	01.10.1973 - 30.09.1975
Studium	Oktober 1975 März 1976 Pädagogische Hochschule Ludwigsburg Dezember 1976 - August 1977 Praktikum in landwirtschaftlichen Betrieben bei Ludwigsburg September 1977 - April 1978 Allgemeine Agrarwissenschaften in Stuttgart-Hohenheim September 1978 - Juli 1984 Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen	17.07.1984
Approbation	08.08.1984
Dissertation	seit Oktober 1984
Berufsausübung	vom 01.12.1985 - 31.12.1986 als Assistenztierarzt in der Großtierpraxis von Dr. Hofmann in Rottenburg/Laaber seit 15.01.87 als stellvertretender Leiter des Städt. Veterinäramtes in Schwäbisch Gmünd
Sonstiges	Mai 1976 - November 1976 Arbeiter bei der Deutschen Bundespost Februar 1981 - März 1981 Ausbildung zum Besamungstechniker in Neustadt/Aisch

THE HISTORY OF THE

CHAPTER I	OF THE ORIGIN AND PROGRESS OF THE ART OF PRINTING
SECTION I	OF THE ORIGIN OF THE ART
SECTION II	OF THE PROGRESS OF THE ART
SECTION III	OF THE PRESENT STATE OF THE ART
SECTION IV	OF THE IMPROVEMENTS OF THE ART
SECTION V	OF THE EFFECTS OF THE ART
SECTION VI	OF THE CAUSES OF THE DECLINE OF THE ART
SECTION VII	OF THE REMEDIES FOR THE DECLINE OF THE ART
SECTION VIII	OF THE FUTURE PROSPECTS OF THE ART
SECTION IX	OF THE CONCLUSION OF THE ART
SECTION X	OF THE APPENDIX TO THE ART
SECTION XI	OF THE INDEX TO THE ART
SECTION XII	OF THE GLOSSARY TO THE ART
SECTION XIII	OF THE BIBLIOGRAPHY TO THE ART
SECTION XIV	OF THE CRITICAL APPRAISAL OF THE ART
SECTION XV	OF THE ETHICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XVI	OF THE POLITICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XVII	OF THE ECONOMIC CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XVIII	OF THE LEGAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XIX	OF THE MEDICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XX	OF THE AESTHETIC CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXI	OF THE PHILOSOPHICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXII	OF THE THEOLOGICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXIII	OF THE HISTORICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXIV	OF THE LITERARY CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXV	OF THE SCIENTIFIC CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXVI	OF THE ARTS AND CRAFTS OF THE ART
SECTION XXVII	OF THE MECHANICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXVIII	OF THE CHEMICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXIX	OF THE PHYSICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXX	OF THE MATHEMATICAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXXI	OF THE AGRICULTURAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXXII	OF THE DOMESTIC CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXXIII	OF THE MILITARY CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXXIV	OF THE NAVAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXXV	OF THE AIR FORCE CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXXVI	OF THE SPACE CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXXVII	OF THE ENVIRONMENTAL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXXVIII	OF THE CLIMATE CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XXXIX	OF THE SOIL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XL	OF THE WATER CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XLI	OF THE AIR CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XLII	OF THE FIRE CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XLIII	OF THE LIGHT CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XLIV	OF THE SOUND CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XLV	OF THE TASTE CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XLVI	OF THE SENSE CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XLVII	OF THE MIND CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XLVIII	OF THE HEART CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION XLIX	OF THE SOUL CONSIDERATIONS OF THE ART
SECTION L	OF THE GOD CONSIDERATIONS OF THE ART

